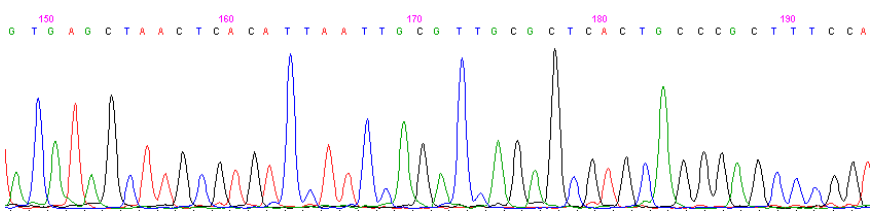
# Guide de dépannage en **séquençage** pour système d'analyses génétiques CEQ™

# *Troubleshooting guide*



# SOMMAIRE


Section I : Diagnostic général 2
Données brutes – Bon signal de données brutes 2
Profil de courant – Profil de courant normal 3

Section II : Détecter un problème sur le CEQ™ 4
A- Est-ce un problème lié à l'instrument ou à la chimie ? 4
1) Diagnostic à l'aide de l'ADN test pour séquençage (réf. 608070) 4
2) Validation des composants du kits DTCS de séquençage 5
3) Les réactifs de l'utilisateurs sont suspects 5
4) Le problème vient-il de la matrice ou de l'amorce 5

B- Problèmes de courant 6
1) Injection électrocinétique – théorie 6
2) Diagnostiquer les problème de courant : à quoi doit ressembler le profil de courant 6
a) Un courant qui décroît graduellement 6
b) Un courant irrégulier ou un courant qui s'effondre 7
c) Les 8 capillaires présentent un même courant irrégulier 10

C- Problèmes de données brutes 11
1) Types de problèmes de signaux de données brutes 11
2) Diagnostiquer les problèmes d'intensité de courant 11
3) Les causes d'un faible signal de données brutes 11
a) Faibles données brutes dues à un manque de matrice 11
b) Faibles données brutes dues à des problèmes d'amorces 13
i) Quantité et qualité de l'amorce 13
ii) Conception de l'amorce (design) 13
c) Faibles données brutes dues à une formamide de mauvaise qualité 15
d) Faibles données brutes dues à l'utilisation d'eau en remplacement du SLS 15
e) Faibles données brutes dues à une injection insuffisante d'échantillon 16
f) Faibles données brutes dues à la qualité de l'huile minérale 17
g) Faibles données brutes dues à des problèmes de thermocyclage 17
4) Données brutes de fluorescence trop élevées 19
5) Les phénomènes d'insertion 20
a) Les insertions dues aux amorces n-1 20
b) Les insertions dues à un mélange de matrices, un mélange d'amorces ou un mauvais appariement d'amorce 21
6) Bruit de fond élevé 23

Section III : Tableau d'aide rapide au diagnostic 24

Section IV : En résumé 28

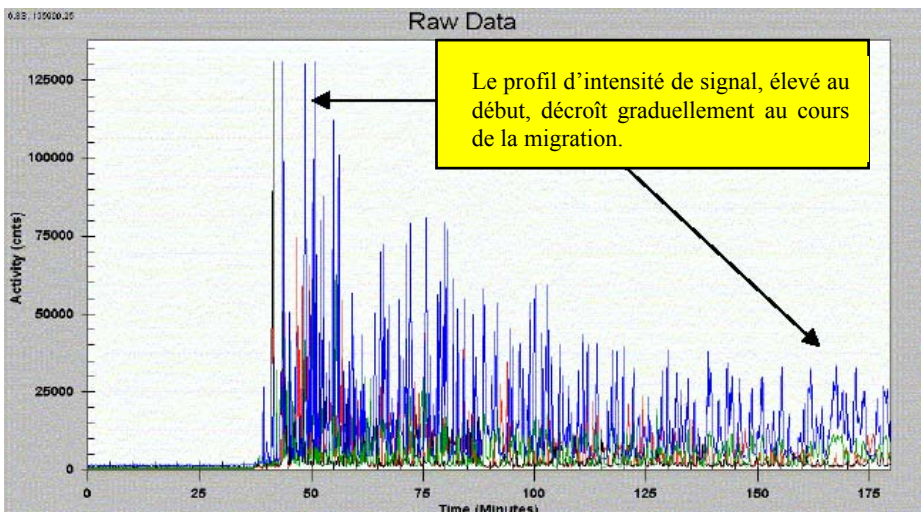
# Section I : Diagnostic général

Le système CEQ™ présente plusieurs outils permettant à l'utilisateur d'identifier et de résoudre rapidement les problèmes.

A cet effet, les 2 éléments les plus utiles sont les **données brutes** (raw data) et le **profil de courant** au cours de la séparation électrophorétique. Dans certains cas, les données analysées peuvent être utilisées mais uniquement après s'être assuré que les profils des données brutes et du courant sont corrects.

## DONNEES BRUTES – BON SIGNAL DE DONNEES BRUTES

Les données brutes générées par le système CEQ™ sont accessibles en temps réel pendant une séparation électrophorétique mais sont aussi disponibles à partir du module d'analyse (« Sequencing »). Lorsque l'on consulte les données brutes, la principale caractéristique à regarder est l'**intensité du signal**. En règle générale, l'intensité du signal décline de manière graduelle au cours de la migration comme décrit ci-dessous :




Dans l'exemple ci-dessus, l'intensité de signal en début de séparation est proche de 125 000 RFU (unité relative de fluorescence) puis décroît jusqu'à la valeur de 25 000 RFU en fin de migration. L'intensité de signal est un paramètre important car en absence de signal d'intensité suffisante, il est peu probable d'obtenir un appel de bases précis.

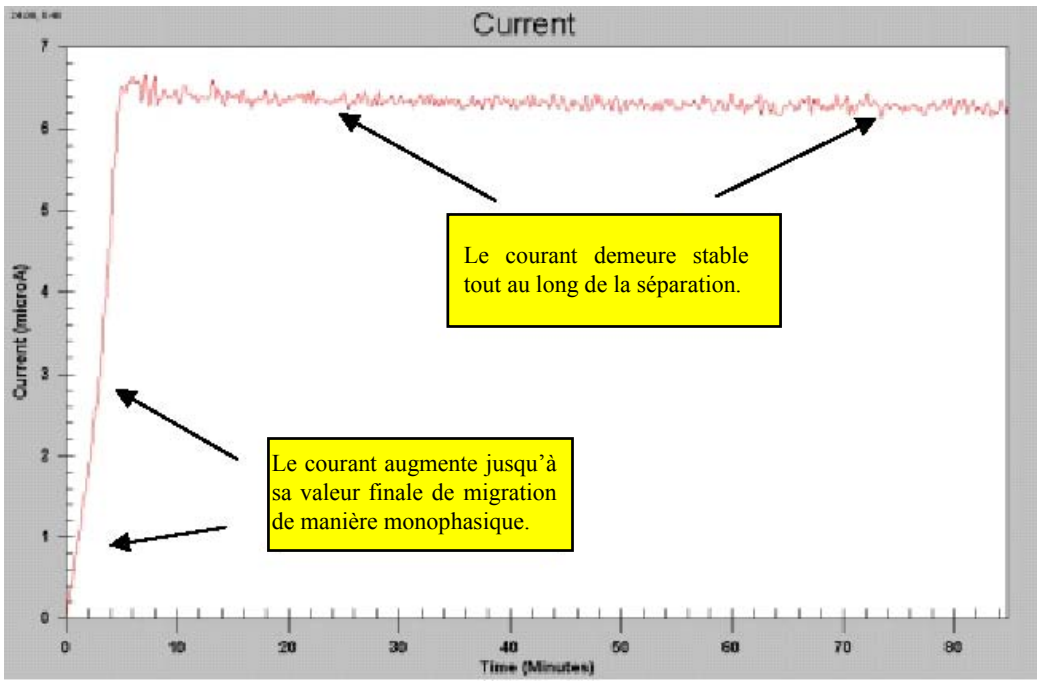
L'exemple représenté ci-dessus montre une intensité de fluorescence excellente. Néanmoins, il n'est pas nécessaire pour chacun des échantillons analysés d'avoir une si importante intensité de signal pour aboutir à un appel précis de bases.

La caractéristique importante à se rappeler est le rapport signal / bruit. Avec un rapport signal / bruit proche de 3 : 1, le logiciel pourra procéder à un appel précis de bases. Ainsi, un profil de données brutes commençant à 25 000 RFU et se terminant à 5 000 RFU (associé à une ligne de base de 1 500 RFU) aboutira à une séquence correctement appelée.

## PROFIL DE COURANT – PROFIL DE COURANT NORMAL

Lorsqu'une séparation électrophorétique a lieu, le système CEQ™ affiche de manière continuelle et en temps réel le courant qui traverse chacun des 8 capillaires. Ce profil de courant – qui peut par la suite être consulté pour chacun des échantillons dans le module d'analyse (« Sequencing ») – peut être très utile pour le diagnostic de certains problèmes.

Un profil normal de courant doit présenter l'aspect ci-dessous :


Current
Current (microA)
Time (Minutes)
Le courant demeure stable tout au long de la séparation.
Le courant augmente jusqu'à sa valeur finale de migration de manière monophasique.

Avec les méthodes LFR, le profil de courant atteint directement sa valeur finale. Cette dernière doit être comprise entre 5 et 9 µA et doit rester stable tout au long de la séparation (profil en plateau). Cette valeur est déterminée par le voltage de séparation employé, lui même défini dans la méthode de séparation appliquée à l'échantillon.

# Section II : Détecter un problème sur le CEQ™

## A- EST-CE UN PROBLEME LIE A L'INSTRUMENT OU A LA CHIMIE ?

Afin de diagnostiquer de manière efficace un problème sur le système CEQ™ il faut adopter une approche systématique. Le premier test à réaliser est de procéder à la séparation d'un ADN test pour séquençage (réf. 608070) avec la méthode Seq-Test.

Après avoir obtenue une analyse couronnée de succès, il sera procédé au séquençage de l'ADN contrôle pUC18 fourni dans chaque kit (réf. 608000 et 608120). Enfin, les échantillons du laboratoire pourront alors être séquencés. Ces 3 test permettent de juger l'intégrité des données brutes, du profil de courant et des données analysées. Ci-dessous se trouvent listées en détail les opérations à mener pour l'ensemble de ces 3 tests en vue de diagnostic.

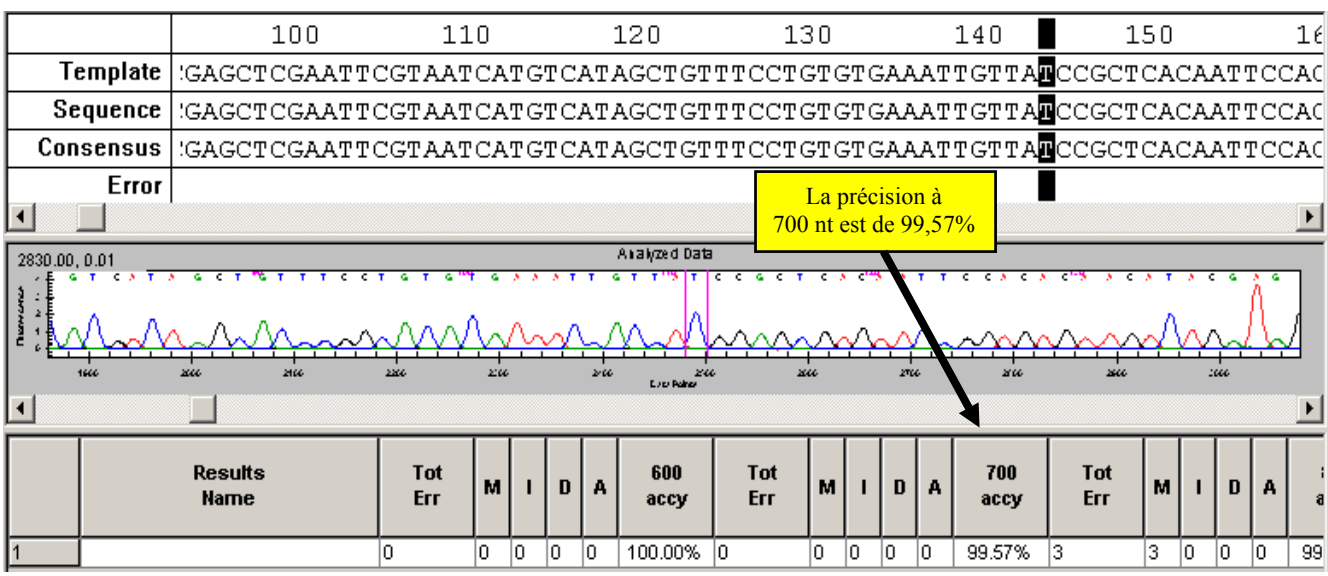
### 1) Diagnostic à l'aide de l'ADN test pour séquençage (réf. 608070) :

L'ADN test pour séquençage est employé pour confirmer le bon fonctionnement de l'appareil et des différents consommables qu'il emploie (gel de séparation, jeu de capillaires, tampon de séparation). Ce contrôle consiste en une réaction de séquençage purifiée, réalisée à partir de la même matrice ADN pUC18 fournie dans les kits DTCS de séquençage.

Ce contrôle doit générer des données de fluorescence d'intensité initiale comprise entre 50 000 et 120 000 RFU. L'intensité doit ensuite décroître de manière graduelle jusqu'à la fin de la phase de séparation. Le profil de courant doit entre autre présenter un aspect normal (se référer à la section précédente). Enfin, il est nécessaire de vérifier la précision de lecture afin de contrôler si l'instrument répond à ses spécifications à savoir une précision de 98% à 700 bases (réaliser l'alignement avec la matrice contrôle pUC18dG).

Si l'ADN test permet l'obtention de bons résultats (bonnes données brutes, profil de courant normal et spécifications atteintes à 700 bases), cela signifie que l'instrument et les consommables associés ne sont pas en cause. Le diagnostic approfondi des problèmes devra alors se focaliser sur la chimie.

La figure ci-dessous montre un exemple d'un ADN test dépassant les spécifications normalement requises à 700 bases.




| | Results Name | Tot Err | M | I | D | A | 600 accy | Tot Err | M | I | D | A | 700 accy | Tot Err | M | I | D | A | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100.00% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 99.57% | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 99 |

Si l'ADN test ne permet pas l'obtention de bons résultats (données brutes anormales, profil de courant instable et spécifications non atteintes à 700 bases), il faut tester les consommables associés tels que le gel de séparation, le jeu de capillaires et un autre lot d'ADN test. Les différents consommables doivent être testés séparément afin d'identifier celui qui est défectueux. Si malgré la substitution de chacun des consommables aucun résultat n'est obtenu, contactez le service après vente Beckman Coulter afin de faire intervenir un ingénieur de maintenance.

### 2) Validation des composants du kit DTCS de séquençage :

Après avoir vérifié que l'instrument ainsi que le gel de séparation et le jeu de capillaires ne sont pas incriminés dans le problème rencontré, il faut préparer des réactions de séquence avec le pUC18 et l'amorce –47 fourni dans le kit.

Ce test permet de discriminer si le problème provient des réactifs fournis par Beckman Coulter ou bien des réactifs employés au laboratoire.

Les résultats qui sont conformes aux spécifications du système (précision de 98% à 700 nt) confirment la qualité des réactifs Beckman Coulter ainsi que les réactifs et matériels de l'utilisateur à l'exception des matrices ADN qu'il séquence et des amorces qu'il emploie à cet effet.
Si le test ne donne pas une précision de 98% à 700 nt, il est d'usage de recommencer à l'aide d'un autre kit de séquençage (si possible n'appartenant pas au même numéro de lot). Si l'échec se renouvelle avec un second kit, les réactifs du laboratoire ou la méthode de purification peuvent paraître suspects. Dans le cas où ce sont les réactifs de l'utilisateur qui sont incriminés, passer à la section suivante.

### 3) Les réactifs de l'utilisateur sont suspects :

L'utilisateur apporte plusieurs réactifs qui peuvent avoir un impact sur les données brutes de fluorescence mais aussi sur le profil de courant. Ces réactifs sont essentiellement ceux employés lors de la purification des réactions de séquence par précipitation éthanol tels que acétate de sodium, EDTA et éthanol. Dans certains cas, lors de l'emploi de vieux kits de séquençage, la formamide fournie par l'utilisateur peut aussi être source d'ennuis.

En règle générale, le symptôme traditionnel lié à l'emploi d'acétate de sodium, d'EDTA, d'éthanol ou de formamide de mauvaise qualité est l'obtention de données brutes de faible intensité occasionnellement associées à des profils irréguliers de courant.

L'utilisation d'acétate de sodium et d'EDTA fournis par Sigma ainsi que du SLS inclus dans chaque kit de séquençage permettra d'éliminer presque tous les problèmes liés à l'emploi de réactifs de qualité médiocre. Si l'un de ces réactifs est suspect, remplacer chacun d'eux de manière systématique (un seul à la fois) afin d'identifier l'élément défectueux. Si la matrice contrôle atteint les spécifications (98% à 700 nt) mais que les échantillons de l'utilisateurs ne donnent pas de bons résultats, passer à la section suivante.

### 4) Le problème vient-il de la matrice ou de l'amorce ?

Après avoir prouvé la bonne fonctionnalité de la matrice contrôle pUC18 et de son amorce de séquençage –47, les échantillons de l'utilisateur peuvent être séquencés. Dans la mesure du possible, les réactifs doivent être testés individuellement en vue de cibler de manière plus efficace l'identification des composants défectueux. Par exemple, si l'utilisateur emploie une matrice ADN qui peut être séquencée avec l'amorce –47, une comparaison simultanée des réactions de séquence faite avec cette amorce et une des amorces de l'utilisateur pourra être réalisée.

## B- PROBLEMES DE COURANT

### 1) Injection électrocinétique - théorie :

Les problèmes de courant sont généralement associés à l'injection électrocinétique de l'échantillon et à la séparation des fragments d'ADN séquencé dans le gel de polyacrylamide linéaire (LPA-1). Le système d'injection électrocinétique permet de charger les molécules chargées négativement dans la matrice LPA-1, à l'extrémité des capillaires. Ces molécules chargées négativement comprennent les fragments de séquençage terminés par un fluorochrome – qui sont les molécules que l'on souhaite séparer – mais aussi d'autres molécules telles que la matrice ADN, des protéines, des sels, les dNTPs et les terminateurs marqués non incorporés. Comme le système CEQ™ emploie la technique d'injection électrocinétique pour déposer les échantillons dans les capillaires, il est possible que des éléments non désirables soient introduits dans les capillaires. Parmi l'ensemble des molécules indésirables, la plus problématique est la matrice ADN présente dans la réaction DTCS.

Ci-dessous se trouvent listés des exemples de problèmes de courant liés à la matrice ADN et dans une moindre mesure à des protéines et autre macromolécules chargées.

### 2) Diagnostiquer les problèmes de courant : à quoi doit ressembler le profil de courant ?

**a) Un courant qui décroît graduellement :**

Les matrices d'ADN super enroulé comme les molécules d'ADN plasmidique ont tendance à entrer en grande quantité dans les capillaires et boucher leur extrémité. Il en résulte une augmentation de la résistance et une chute du courant au cours de la séparation. Les capillaires bouchés présentent 2 sortes de problèmes de courant. Dans les cas où le profil de courant présente une chute graduelle sans variation irrégulière, il est couramment observé des longueurs de lecture courtes. Cette diminution de la longueur de lecture est le résultat d'un ralentissement général de la vitesse de séparation des fragments d'ADN. Ainsi, il passe au niveau de la fenêtre de détection moins de fragments d'ADN marqué et par conséquent moins de bases sont séquencées.

En règle générale, les molécules d'ADN linéaire telles que les produits de PCR ou les produits de digestion d'endonucléase de restriction ne posent pas de problème de courant.

D'autre part, d'autres macromolécules qui co-purifient avec les matrices ADN peuvent également générer des problèmes de courant. Parmi ces macromolécules se trouvent les protéines, glycoprotéines, ADN chromosomique bactérien, ARN et débris de la paroi cellulaire.

Actions correctives pour résoudre les problèmes mineurs de courant :

Une diminution graduelle du courant au cours de la séparation indique qu'il peut y avoir un excès de matrice ADN dans la réaction de séquençage ou que la matrice est très fortement super-enroulée. Il existe plusieurs solutions pour remédier à ces problèmes (listées de la plus simple à la plus élaborée).

1- Si les données brutes sont en quantité suffisante, il suffit souvent de diminuer le temps d'injection des échantillons dans les capillaires pour améliorer la longueur de lecture ainsi que la précision d'appel des bases. Le simple fait de refaire migrer l'échantillon en diminuant de moitié le temps d'injection peut résoudre le problème (i.e. si l'injection initiale était 2 kV pendant 60 secondes, appliquer 2 kV pendant 30 secondes).

2- Une autre alternative si les données brutes sont en quantité suffisante est de réduire la quantité de matrice mise en présence dans la réaction de séquençage. Dans ce cas, la diminution de moitié de la quantité de matrice peut éliminer le problème (i.e. si la quantité initiale de matrice était 100 fmoles, employer 50 fmoles pour la nouvelle réaction de séquence).

3- Procéder au préchauffage de la matrice ADN avant la réaction de séquençage. Le traitement par préchauffage (se référer au guide détaillé d'utilisation du kit de séquençage DTCS) provoque des coupures de l'ADN (*nicking*) qui allège la structure super-enroulée des ADN plasmidiques. Rappelons que les matrices ADN super-enroulées sont la cause principale des problèmes de courant.

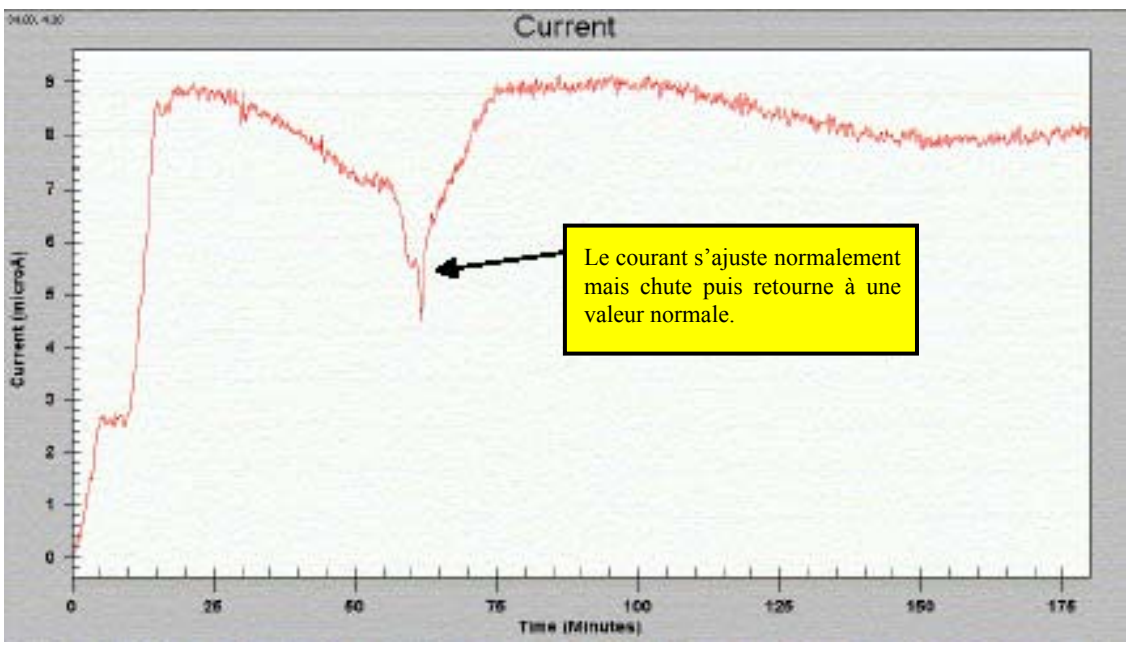
4- Il est possible de procéder à la combinaison – à des degrés variés - des recommandations 1, 2 et 3 pour éliminer les problèmes de courant. Par exemple, réaliser une étape de préchauffage sur 50 fmoles de matrice.

5- Employer des techniques de purification des matrices ADN qui éliminent les macromolécules telles que les protéines, glycoprotéines, ADN chromosomique bactérien, ARN et débris de la paroi cellulaire. La plupart des méthodes de préparation des ADN commercialisées permettent d'obtenir des ADN exempts de macromolécules contaminantes.

6- Eliminer la matrice de la réaction de séquençage. Il s'agit d'un procédé très élaboré qui nécessite l'emploi d'amorces et de réactifs particuliers mais qui aboutit à des réactions de séquence ne présentant aucun problème de courant. La technique la plus courante consiste à employer des amorces de séquençage biotinylées ainsi que le kit de purification de réaction de séquence DynaPureII™ (Dynal Inc., Oslo, Norvège, référence produit 603.05) qui permet l'élimination de contaminants tels que la matrice ADN, les terminateurs marqués non incorporés, les dNTPs et autres sels.

**b) Un courant irrégulier ou un courant qui s'effondre :**

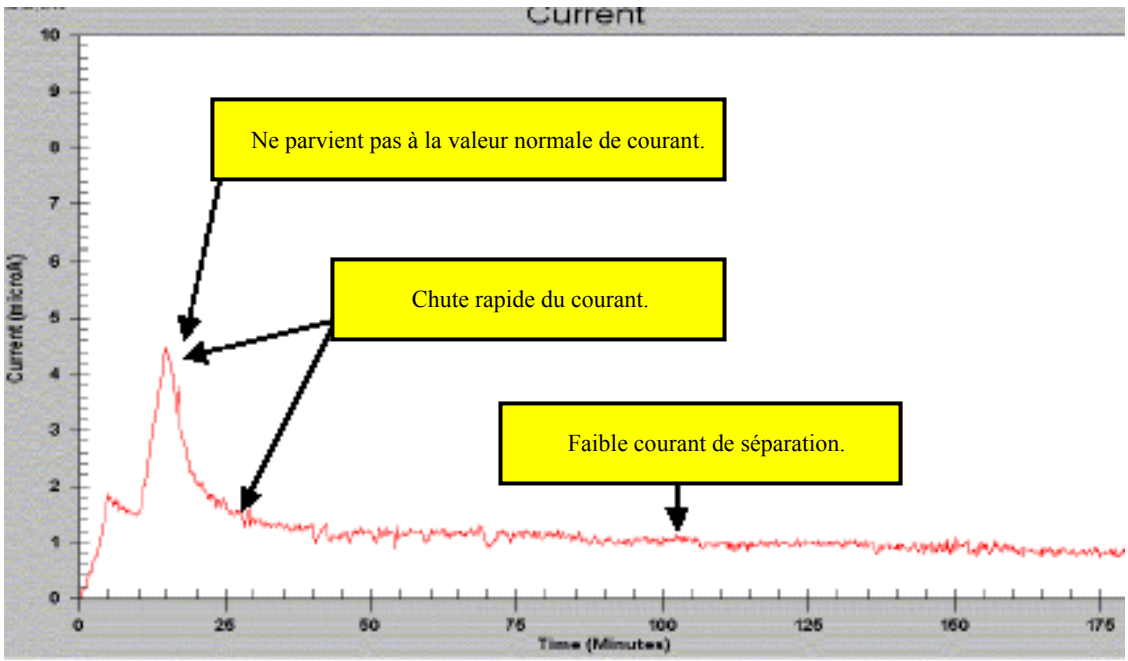
Dans les cas les plus graves où le profil de courent est instable, le flux de fragment d'ADN marqués ne passe pas au niveau de la fenêtre de détection à un taux constant aboutissant à des erreurs de séquençage. Le logiciel de séquençage est conçu pour compiler des données de fluorescence associées à des fragments d'ADN qui migrent à une vitesse relativement constante. Cela permet au logiciel d'estimer l'espacement des fragments, donnée prise en compte lors de l'appel des bases. Si l'espacement entre les pics est augmenté (trop peu de base par minute) ce qui arrive dans les régions où le courant a chuté rapidement, le logiciel peut insérer des bases additionnelles dans la séquence. Les figures ci-après montrent respectivement des exemples de courant irrégulier et de courant qui s'effondre.




**Courant irrégulier**

Si le courant est instable ou irrégulier, le temps de migration des bases sera affecté ce qui peut entraîner des imprécisions dans l'appel des bases. Dans l'exemple précédemment montré, la vitesse de migration des bases pendant la période où le courant ne s'est pas maintenu à une valeur stable aura été ralentie et la fiabilité d'appel s'en trouvera diminuée.

En plus d'une imprécision d'attribution des bases, la longueur totale de lecture sera également diminuée à cause d'une vitesse de séparation amoindrie.




**Courant qui s'effondre**

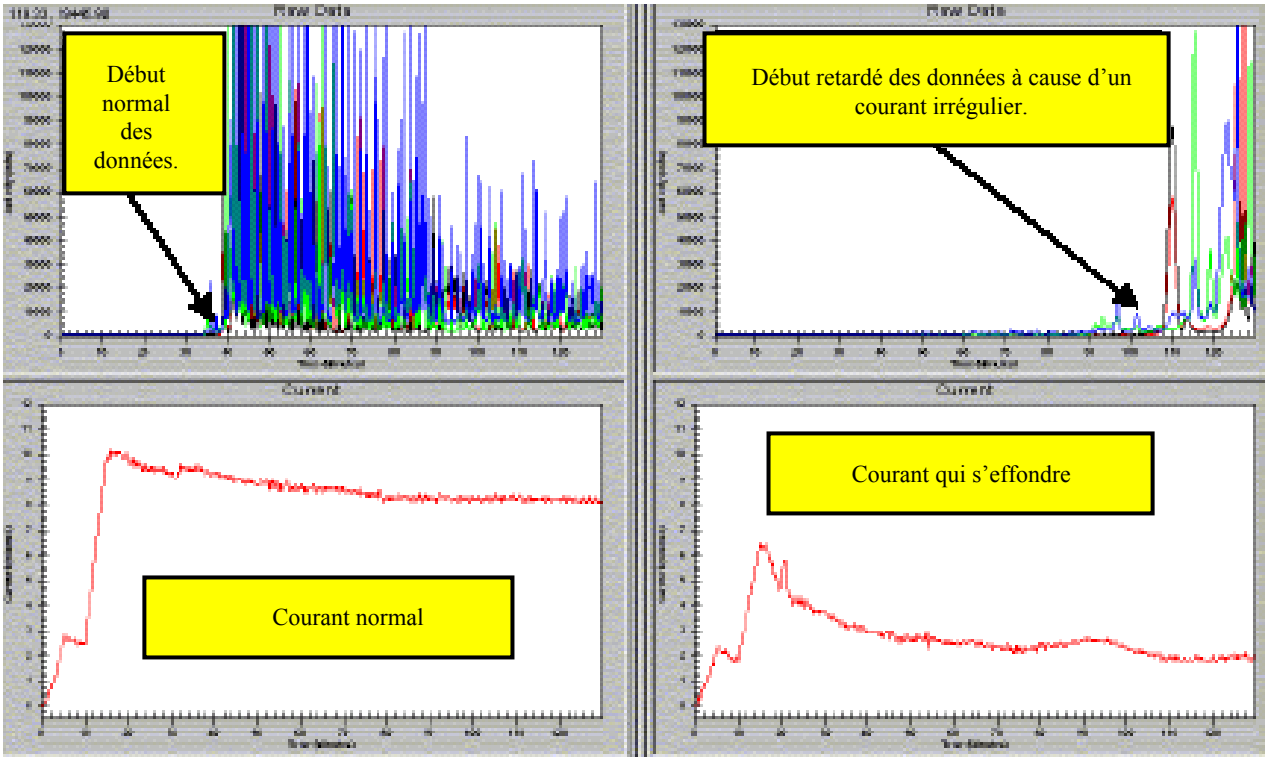
Dans d'autres cas, les problèmes de courant peuvent être plus significatifs. La figure ci-dessus montre un profil de courant qui ne parvient pas à atteindre la valeur normale et finale de migration (8 – 12 µA) pour chuter rapidement à une valeur inférieure à 2 µA.

Actions correctrices pour résoudre les problèmes de courant irrégulier ou qui s'effondre :

La survenue de profil de courant irrégulier indique qu'il y a un problème accru de surcharge des capillaires par l'échantillon. Dans ces cas, il faut prendre des mesures plus drastiques.
Dans le cas d'un profil de courant irrégulier, refaire migrer l'échantillon en diminuant de moitié le temps d'injection ne permettra pas de résoudre le problème. Les étapes nécessaires sont les suivantes :

1- Si les données brutes de fluorescence sont en quantité suffisante, il suffira dans une première intention de diminuer (de moitié) la quantité de matrice dans la réaction de séquençage (i.e. si la quantité initiale de matrice était 100 fmoles, employer 50 fmoles pour la nouvelle réaction de séquence).

2- Le traitement de préchauffage de la matrice ADN avant la réaction de séquençage est fortement recommandé pour les échantillons de plasmides super-enroulés afin d'éliminer les problèmes de courant irrégulier ou qui chute (i.e. préchauffage à +96°C pendant 1 minute avant l'ajout de l'amorce et du prémix). Les exemples ci-après montrent les améliorations obtenues après un tel traitement des échantillons.


Début normal des données.
Début retardé des données à cause d'un courant irrégulier.
Courant normal
Courant qui s'effondre

50 fmol de matrice préchauffée pendant 1 minute à +96°C

50 fmol de matrice non préchauffée

3- Une méthode alternative au traitement par préchauffage est de linéariser le plasmide par une endonucléase de restriction avant d'ajouter la matrice dans la réaction de séquençage. En effet, cette méthode permet de convertir un plasmide avec une structure super-enroulée en une molécule linéaire. Cette dernière se comporte alors comme un produit de PCR (pour lesquels - en règle générale - il n'est pas observé de problème de courant. Cette méthode, très efficace, nécessite de connaître la carte de restriction du plasmide afin de déterminer selon le site de coupure choisi, l'enzyme de restriction à employer. Le plasmide doit être coupé en une position avale de la séquence étudiée. Par exemple, si l'amorce de séquençage s'hybride sur le plasmide au niveau de la position n° 100 et que la séquence désirée est comprise entre les positions n° 100 et 600, le site de reconnaissance de l'endonucléase de restriction devra se trouver à la position 601 ou supérieure.

4- L'élimination de la matrice lors de la purification des réactions de séquence est la seule méthode efficace pour éliminer les problèmes d'instabilité de courant. Il s'agit d'un procédé très élaboré qui nécessite l'emploi d'amorces et de réactifs particuliers mais qui aboutit à des réactions de séquence ne présentant aucun problème de courant.

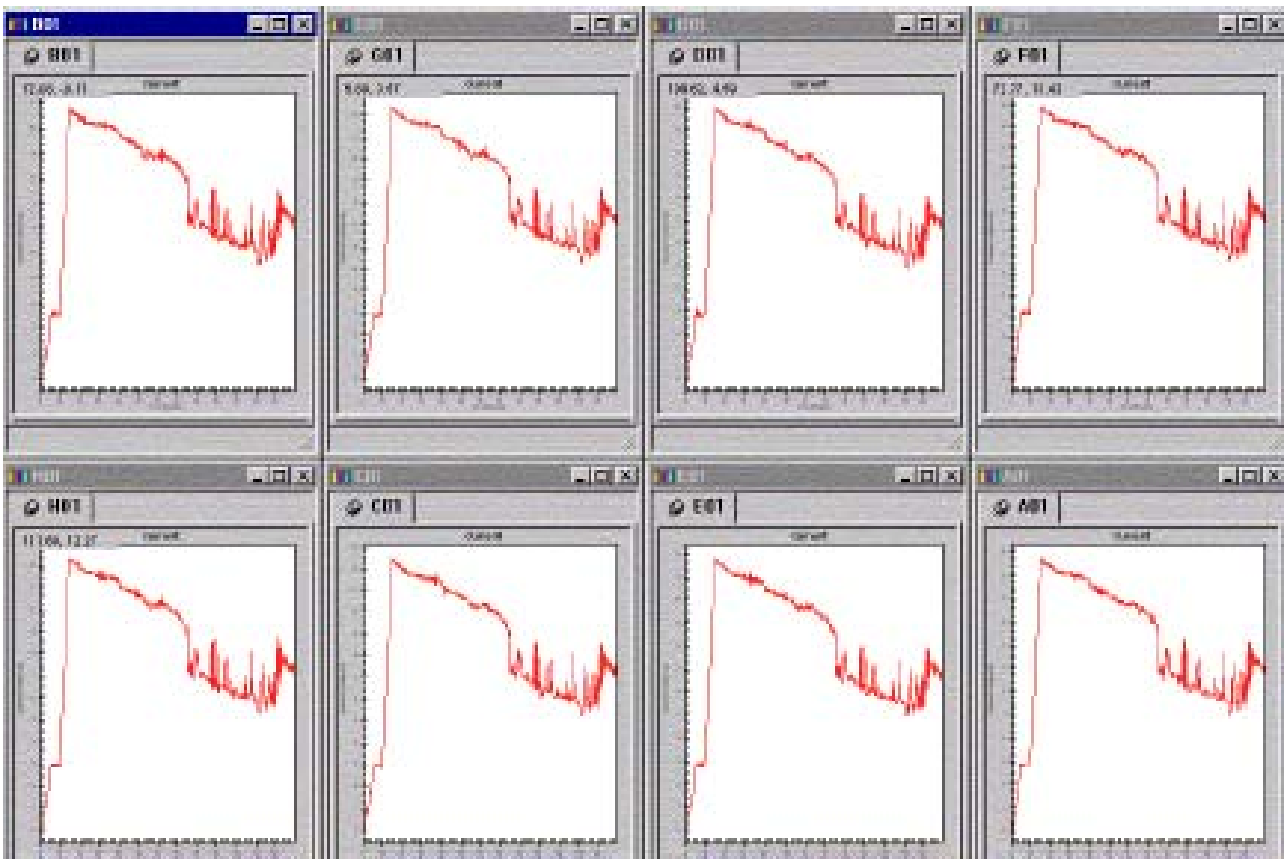
**c) Les 8 capillaires présentent un même courant irrégulier :**

Si les 8 capillaires présentent des problèmes identiques de courant irrégulier, le problème consiste en un blocage du passage électrique au niveau du collecteur (« manifold »). La cause la plus fréquente de ce genre de problème est la présence d'une bulle d'air à proximité de l'électrode qui gène le passage du courant.

La conséquence est que les 8 capillaires vont présenter des longueurs de lecture moindres vraisemblablement associées à des erreurs lors de l'appel des bases. Ce genre de profil met en cause un problème au niveau du système de migration plutôt qu'au niveau des échantillons en cours d'analyse.

La formation de bulles d'air peut avoir plusieurs origines : trop de mouvements de retrait et:ou d'installation de la cartouche de gel, mauvaise mise en place de la fenêtre de détection du jeu de capillaire dans le collecteur d'où une mauvaise adhésion au joint du collecteur, dérangement accidentel du positionnement de l'électrode,…

L'exemple ci-dessous montre des profils de courant d'un jeu de 8 capillaires lors de la présence d'une bulle d'air dans le collecteur du système CEQ™.



Actions correctrices pour résoudre les problèmes de courant liés à la présence d'air dans le collecteur :

1- Procéder à une ou deux purges du collecteur à partir du menu de contrôle direct dans le module de pilotage du système CEQ™.

2- Contacter un ingénieur de maintenance Beckman Coulter si les problèmes persistent.

## C- PROBLEMES DE DONNEES BRUTES

### 1) Les différents types de problèmes de signaux rencontrés en données brutes :

• Il en existe de plusieurs sortes. Le problème le plus commun est une intensité de signal trop faible. Dans ce cas, il n'y a pas assez de signal de fluorescence (représenté sur les électrophorégrammes par l'activité (cnts) en ordonnée) pour générer un appel de bases précis.
• Un autre problème rencontré est une intensité de fluorescence trop importante qui peut saturer le système de détection par photomultiplicateur. L'origine de ce phénomène est due à la présence d'un trop grand nombre de fragments d'ADN marqués.
• Une troisième catégorie de problème est la présence de trop de pics de fluorescence. Ceci peut être du à 2 événements de séquençage indépendants s'étant produit pour un même échantillon. Ce phénomène trouve son origine lorsque la réaction de séquence possède 2 matrices ou plus (contaminations) ou bien lorsque la matrice séquencée présente de multiples site d'hybridation de l'amorce. Une variante de ce phénomène est connue sous le nom de problème de « pré-pic ». Les pré-pics sont dus à une synthèse de faible qualité des amorces employées pour le séquençage. Dans ce cas, une forte proportion d'amorces n-1 est présente (les amorces n-1 sont des amorces plus courtes d'une base que la longueur normalement attendue).
Tous les problèmes ci-dessus mentionnés ainsi que plusieurs autres cas de figure sont présentés et discutés dans les paragraphes suivants.

### 2) Diagnostiquer les problèmes d'intensité de signal :

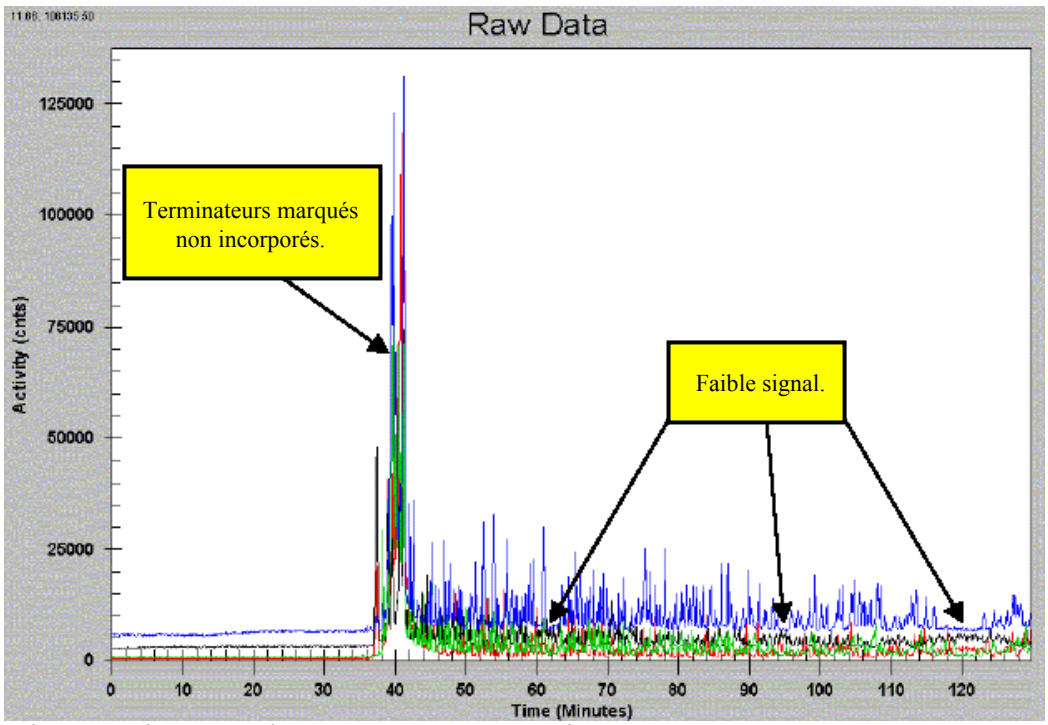
La première étape consiste à observer le signal de fluorescence des données brutes (« Raw Data ») dans le module « *Sequencing* » du logiciel.
Les données représentées graphiquement comme l'Activité (Cnts) en fonction du Temps de séparation (Minutes) doivent présenter des valeurs de fluorescence comprises entre 5 000 et 125 000 cnts Le signal doit être élevé au début puis décliner graduellement au cours de la migration.

### 3) Les causes d'un faible signal de données brutes :

#### a) Faibles données brutes dues à un manque de matrice :

L'une des causes les plus couramment rencontrées pour générer des données brutes de fluorescence faibles est l'insuffisance de matrice ADN mise en présence dans la réaction de séquençage. L'emploi de la quantité correcte de matrice est un élément clé de la réussite du séquençage en électrophorèse capillaire. Nous recommandons l'utilisation de 50 à 100 femtomoles (fmoles) d'ADN plasmidique pour une réaction de séquençage. Cela constitue suffisamment de matrice pour générer des quantités adéquates de fragments de séquençage marqués mais pas trop pour entraîner des problèmes de courant (voir le chapitre sur les problèmes de courant).
La moitié de cette quantité (25 à 50 fmoles) sera employée pour des matrices simple brin telles que l'ADN du phage M13 et des quantités encore moindres seront requises pour les produits de PCR (10 à 50 fmoles pour les produits de PCR de taille inférieure à 3 kb).
Dans la plupart des cas, la quantité de matrice employée pour la réaction de séquençage n'est pas déterminée et très souvent trop peu de matériel est mis en présence. Dans d'autres situations, une approximation incorrecte de la concentration d'ADN est faite. L'estimation de la concentration d'ADN par mesure spectrophotométrique n'est correcte que si l'ADN est pur (comme c'est le cas lors de l'emploi de kits commerciaux de purification d'ADN). Une préparation brute de matrice ADN (i.e. miniprep brute de lyse alcaline) qui présentera des quantités substantielles de protéines et/ou d'ARN, aboutira à une surestimation de la concentration d'ADN. Par conséquent une quantité trop faible de matrice sera employée pour le séquençage.

L'exemple figuré ci-dessous montre le séquençage d'un ADN pour lequel la quantité de matrice employée n'était pas suffisante. Dans cet exemple, 25 fmoles d'ADN ont été ajoutées à la réaction de séquençage. On peut remarquer la faible intensité des données brutes tout au long de la migration, en particulier pour les tracés rouge, vert et noir.
Un indicateur facilement identifiable d'une faible concentration de matrice - et plus généralement - d'une réaction de séquençage faible est la présence d'une grande quantité de terminateurs marqués non incorporés (matérialisés ici par le grand pic aux alentours de 40 minutes).




**Faible quantité de matrice employée dans la réaction de séquençage.**

Actions correctrices :

1- Ajouter la quantité correcte de matrice ADN dans la réaction de séquençage. Cela nécessite une quantification de la matrice par spectrophotométrie (dans le cas d'emploi de kits commerciaux) ou par estimation sur gel d'agarose et comparaison à un ADN de quantité connue.

2- L'utilisateur peut essayer des dilutions en série de la même matrice afin de définir la quantité adéquate d'ADN à employer.

3- Procéder à un préchauffage des matrices plasmidiques super-enroulées. En effet, les matrices linéaires se prêtent à un meilleur séquençage que les structures compactes.

4- Si malgré une quantité adéquate de matrice employée et une étape de préchauffage, l'intensité de signal des données brutes ne s'améliore pas, augmenter le nombre de cycles dans le programme de thermocyclage de 30 à 40 ou 50.

5- Si malgré une quantité adéquate de matrice employée, une étape de préchauffage et/ou une augmentation du nombre de cycles aucune amélioration n'est notée quant à l'intensité des données brutes de fluorescence, il est probable qu'un inhibiteur de l'ADN polymérase soit présent (ne jamais re-suspendre l'ADN dans de l'eau traitée au DEPC). Une purification plus poussée de la matrice ADN sera alors nécessaire. Dans certains cas, une simple précipitation des plasmides à l'éthanol permettra d'éliminer l'inhibiteur alors que d'autres situations nécessiteront l'emploi de méthodes de préparation d'ADN disponibles sur le marché comme les kits Qiaquick de Qiagen.

**b) Faibles données brutes dues à des problèmes d'amorces :**

i) Quantité et qualité de l'amorce :

La quantité et la qualité des amorces employées pour le séquençage peuvent avoir une influence sur l'intensité des données brutes de fluorescence. Ainsi, l'utilisation de quantité insuffisante d'amorce ou l'emploi d'amorce de faible qualité (e.g. une amorce incomplètement déprotégée après sa synthèse) aboutiront à des données brutes de faible intensité. La plupart des fournisseurs d'oligonucléotides procurent des préparations d'amorces suffisamment pures.

La majorité d'entre eux proposent des amorces dessalées qui fonctionnent correctement en séquençage d'ADN. Néanmoins, une purification accrue des amorces par TSP (Titryl Specific Purification) ou HPLC (High Performance Liquid Chromatography) est vivement recommandée surtout si l'on a besoin de données de séquençage de très haute qualité.

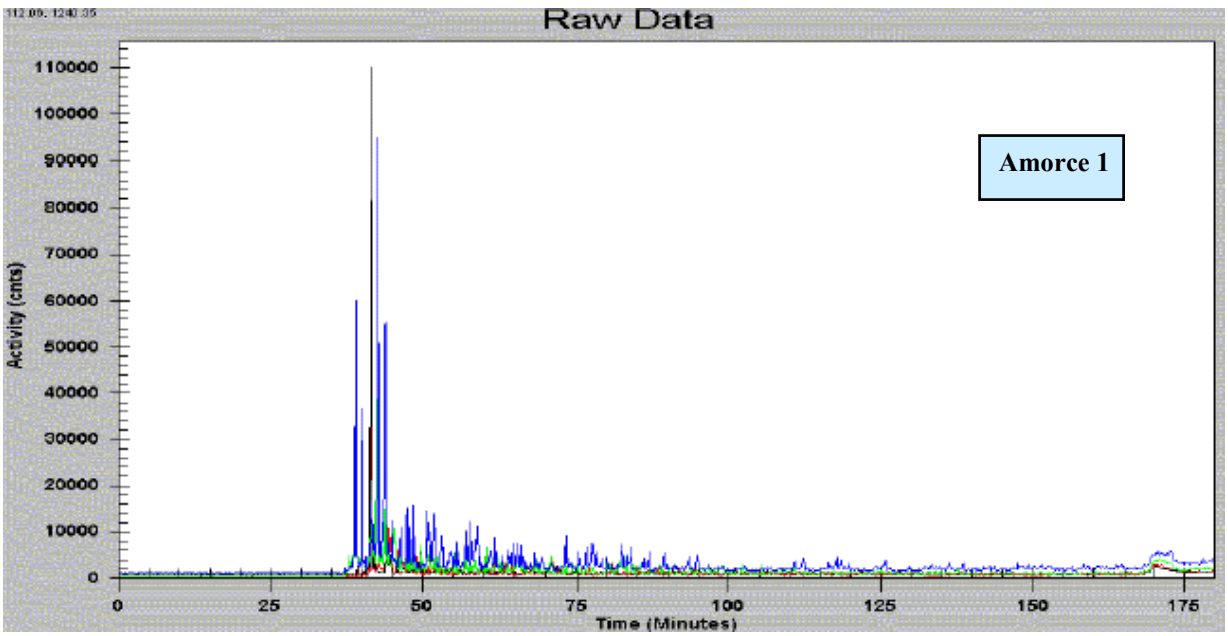
Il a été mis en évidence que des amorces purifiées en électrophorèse sur gel dénaturant pouvaient contenir des inhibiteurs de l'ADN polymérase. En conséquence, il faut éviter l'emploi de telles amorces pour les réactions de séquençage.

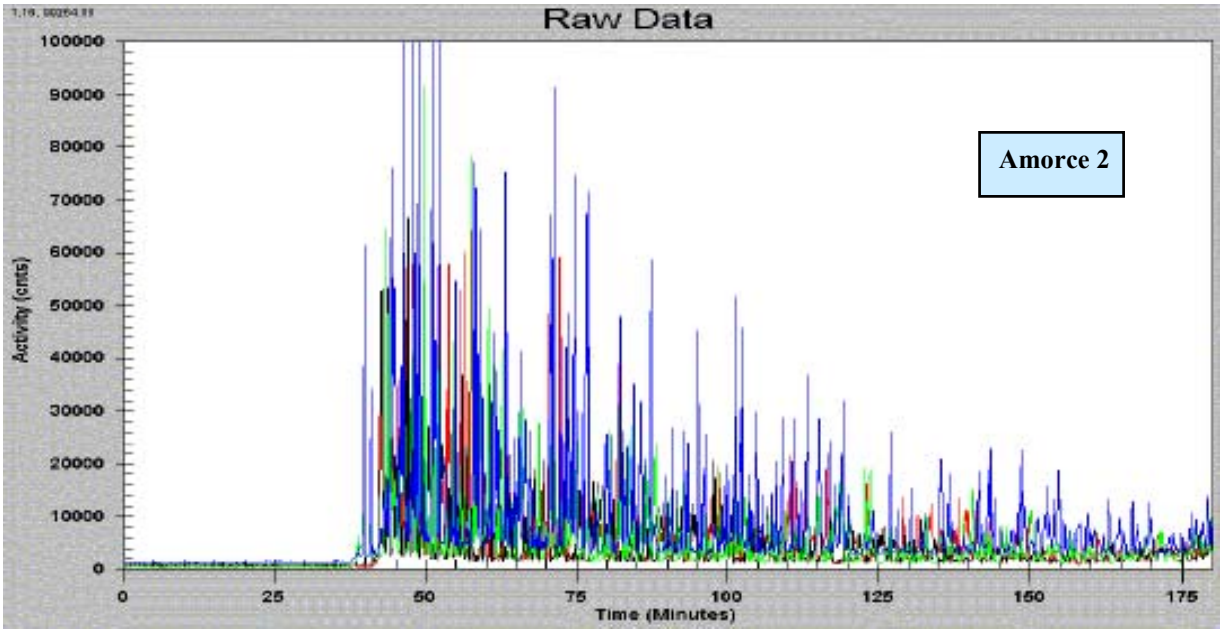
ii) Conception de l'amorce (design) :

Les amorces doivent être correctement choisies pour avoir un Tm suffisamment élevé (supérieur à +55°C), ne pas former de structures secondaires internes (telles que des structures en épingle à cheveux) et avoir une faible probabilité de former des dimères d'amorces. Le Tm des amorces doit être au moins plus élevé de 5°C que la température d'hybridation du programme de thermocyclage (+50°C) afin de se fixer correctement à la matrice ADN et permettre l'extension par la polymérase. La formation de structures secondaires internes ainsi que de dimères d'amorces est favorisée de manière thermodynamique par rapport à l'hybridation de l'amorce à sa matrice. Ainsi, ces phénomènes réduisent la concentration effective d'amorce dans le milieu réactionnel de séquençage.

Dans l'exemple suivant la matrice est la même mais 2 amorces différentes ont été utilisées.

L'amorce n° 1 présente un Tm de +43.5°C, un contenu en GC de 31.6% et une longueur de 19 bases. L'amorce n° 2 présente quant à elle un Tm de +79.8°C, un contenu en GC de 62.5% associés à une longueur de 24 bases. Les effets sur les données générées sur le CEQ™ sont clairs. Avec une réaction peu efficace, l'intensité de signal demeure faible et la précision d'appel des bases n'est pas optimale.






Actions correctrices :

1- Ajouter la quantité adéquate d'amorce à la réaction de séquençage. Cela nécessite une quantification de l'amorce par spectrophotométrie. La quantité recommandée d'amorce est un excès molaire minimum de 40 fois la quantité de matrice. Pour le séquençage de la plupart des matrices ADN, 3 – 10 pmoles d'amorce sont suffisantes pour une réaction de séquençage réussie.

2- S'assurer du degré de pureté de l'amorce utilisée. Se fournir auprès de sociétés connues et reconnues de synthèse à façon d'oligonucléotides est le meilleur moyen d'obtenir des amorces de haute qualité. Si possible, employer des amorces purifiées par TSP ou HPLC.

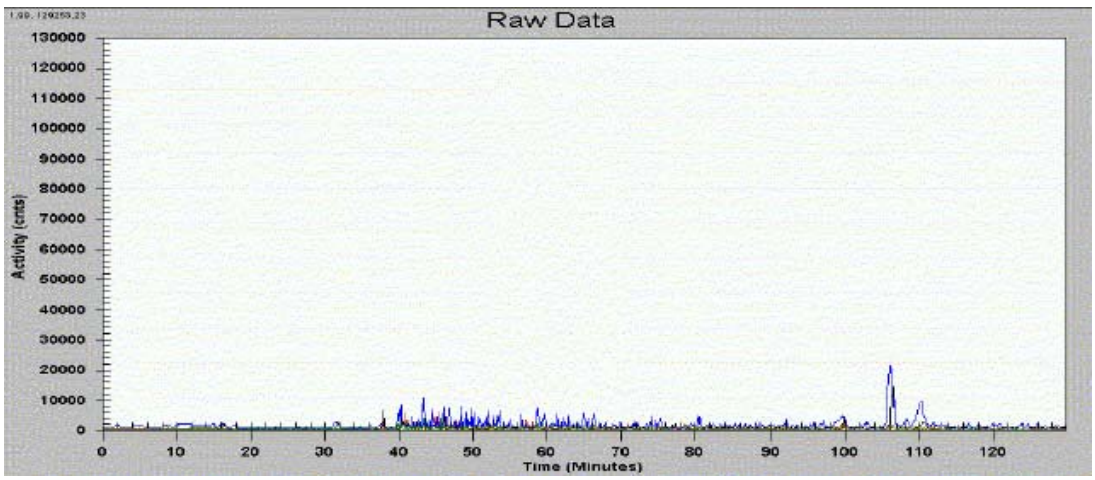
3- Toujours prendre soin de la conception de l'amorce (design) : avoir un Tm élevé, éviter les possibilités de formation de structures secondaires ou de dimérisation d'amorces. Il existe différents logiciels permettant de vérifier ces aspects.

4- S'assurer que l'amorce est remise en suspension dans une solution exempte d'EDTA ou de DEPC. L'eau de qualité Biologie Moléculaire ou un tampon Tris 10 mM, pH8.0 constituent les meilleures solutions de remise en suspension.

5- Augmenter le nombre de cycles dans le programme de thermocyclage de 30 à 40 ou 50.

**c) Faibles données brutes dues à une formamide de mauvaise qualité :**

La formamide sert à la remise en suspension des fragments d'ADN séquencés avant le dépôt des échantillons sur le CEQ™.
Afin d'obtenir des données de séquençage de haute qualité, la solution de formamide doit être préparée et stockée correctement. Si la formamide n'est pas déionisée ni correctement conservée, elle se décomposera en ammoniac et acide formique. Ce dernier détruit les fluorochromes ce qui aboutit à l'obtention de signaux bruts de fluorescence de faible intensité. L'exemple ci-après montre un échantillon qui a été re-suspendu avec une formamide non déionisée. Il est à noter que la précision d'appel de base pour cet échantillon est inférieur à 90% (> 40 bases) à 500 bases.




Actions correctrices :

1- Employer la solution de dépôt des échantillons (SLS) fournie par Beckman Coulter dans les kits de séquençage (réf. 608000 et 608120).

2- Si le SLS n'est pas disponible ou en quantité insuffisante, préparer de la formamide déionisée en suivant les recommandations de l'annexe D de la notice d'utilisation incluse dans chaque kit de séquençage (réf. BCI 608019-AF).

3- Ne pas décongeler et recongeler successivement le SLS ou la formamide déionisée. Pour ce faire, nous recommandons de répartir les solutions en aliquots de 250 µl (1 aliquot correspondant à la quantité nécessaire pour la remise en suspension de 8 échantillons). Conserver les aliquots à –20°C dans un congélateur dépourvu d'un système automatique de dégivrage. N'utiliser qu'une seule fois les aliquots et les éliminer après utilisation.

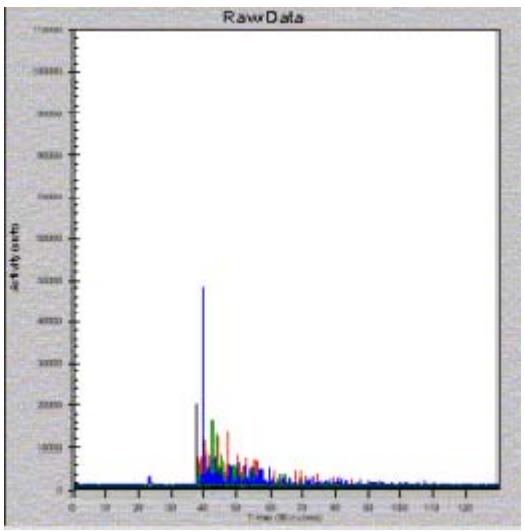
**d) Faibles données brutes dues à l'utilisation d'eau en remplacement du SLS :**

Nous ne recommandons pas d'employer de l'eau pour remettre en suspension les culots d'ADN purifiés avant le dépôt des échantillons sur le CEQ™. Les fluorochromes Beckman Coulter Well Red™ n'étant sont pas stables dans l'eau pure les résultats obtenus seraient similaires à ceux générés par l'emploi d'une mauvaise formamide (se référer au paragraphe précédent).

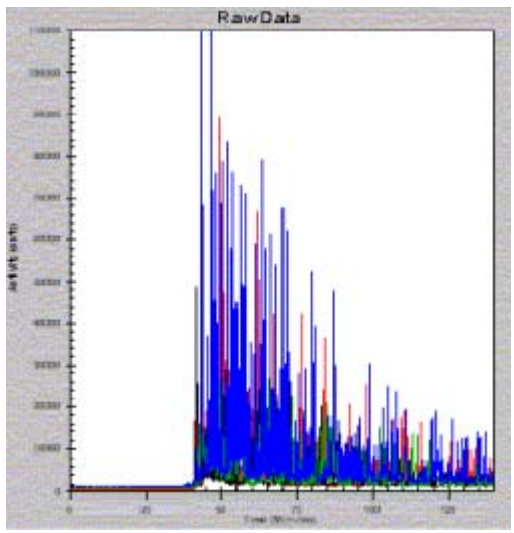
Actions correctrices : se référer au paragraphe précédent.

**e) Faibles données brutes dues à une injection insuffisante d'échantillon :**

Une injection insuffisante de fragments de séquençage dans les capillaires du système CEQ™ aboutit à des données brutes de faible intensité. Employant la technique d'injection électrocinétique, le système CEQ™ est très sensible à la présence de sels en excès dans les échantillons injectés. En effet, les sels en excès entrent en compétition avec les fragments de séquençage au moment de l'injection aboutissant à un chargement moindre de molécules d'ADN marqué. Les sels en excès trouvent généralement leur origine dans des réactions de séquençage incorrectement purifiées et dans les produits de dégradation de la formamide.




Réaction de séquençage avec excès de sels




Réaction de séquençage sans impureté

Actions correctrices :

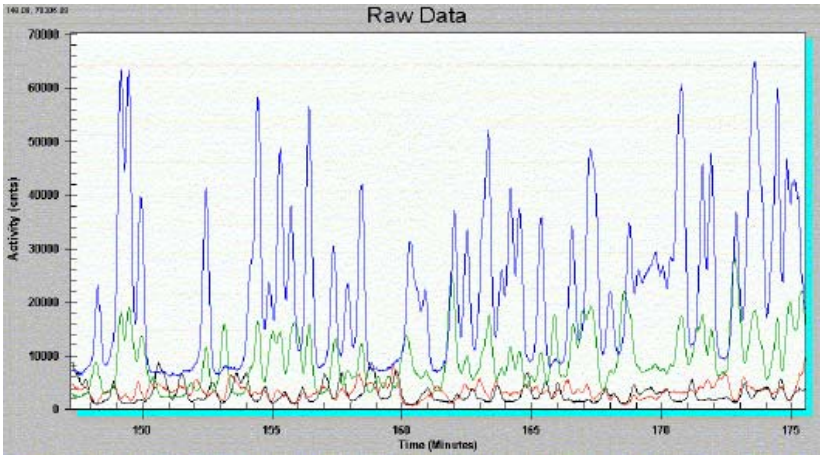
1- Respecter la procédure de purification des réactions de séquence par précipitation à l'éthanol décrite dans les notices d'utilisation incluses dans chaque kit (réf. BCI 608019-AF).

2- Si la procédure de purification retenue est l'emploi de colonnes de filtration, s'assurer que le matériel contenu dans ces colonnes ne contient pas de sels (vérifier auprès du fournisseur la compatibilité de l'emploi de ce genre de colonnes avec les séquenceurs capillaires).

3- Employer la solution de dépôt des échantillons (SLS) fournie par Beckman Coulter dans les kits de séquençage (réf. 608000 et 608120) pour la remise en suspension des échantillons.

**f) Faibles données brutes dues à la qualité de l'huile minérale :**

L'huile minérale incluse dans les kits de séquençage (réf. 608000 et 608120) est une huile de haute qualité dépourvue d'activité nucléasique. L'emploi d'huile minérale de qualité inférieure peut conduire à une dégradation des échantillons et par conséquent à des signaux de faible intensité comme le montre l'exemple ci-dessous.
Les marqueurs rouge et noir sont particulièrement sensibles à ce phénomène.




Actions correctrices :

1- Procéder à une nouvelle réaction de séquençage et employer l'huile minérale incluse dans les kits de séquençage Beckman Coulter.

2- Procéder à une nouvelle réaction de séquençage et employer l'huile minérale de qualité Biologie Moléculaire de chez Sigma (réf. Sigma M-5904).

**g) Faibles données brutes dues à des problèmes de thermocyclage :**

La chimie DTCS du système CEQ™ nécessite l'emploi d'un thermocycleur pour produire une amplification linéaire (appelée séquençage cyclique) et générer suffisamment de siganux de fluorescence pour obtenir un appel de bases précis. Le programme de thermocyclage ainsi que les performances du thermocycleur sont des points critiques pour l'obtention de résultats optimum. Parmi les différents problèmes de thermocyclage qui peuvent être rencontrés figurent les éléments suivants :

1- emploi d'un thermocycleur mal adapté ou ayant de faibles performances,

2- emploi d'un mauvais programme de thermocyclage notamment dans les étapes d'ajustement de la température,

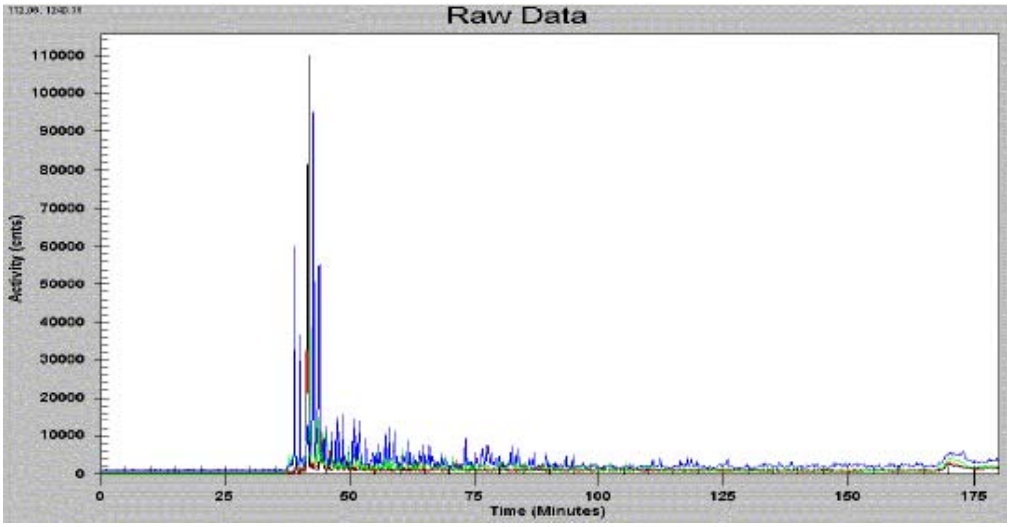
3- utilisation d'une mauvaise température d'hybridation, non adaptée à l'amorce employée au cours du séquençage,

4- emploi de tubes ou de plaques qui ne s'adaptent pas dans le thermocycleur,

5- utilisation d'un thermocycleur dépourvu de couvercle chauffant,

6- perte des capuchons des barrettes ou tubes, emploi de couvercle en silicone ou de film de scellage inadaptés,

L'un de ces éléments conduira à l'obtention de faibles données brutes de fluorescence comme figuré dans la figure ci-après.




Actions correctrices :

1- Vérifier les performances du thermocycleur employé.

2- Vérifier que la montée de température est paramétrée à son maximum.

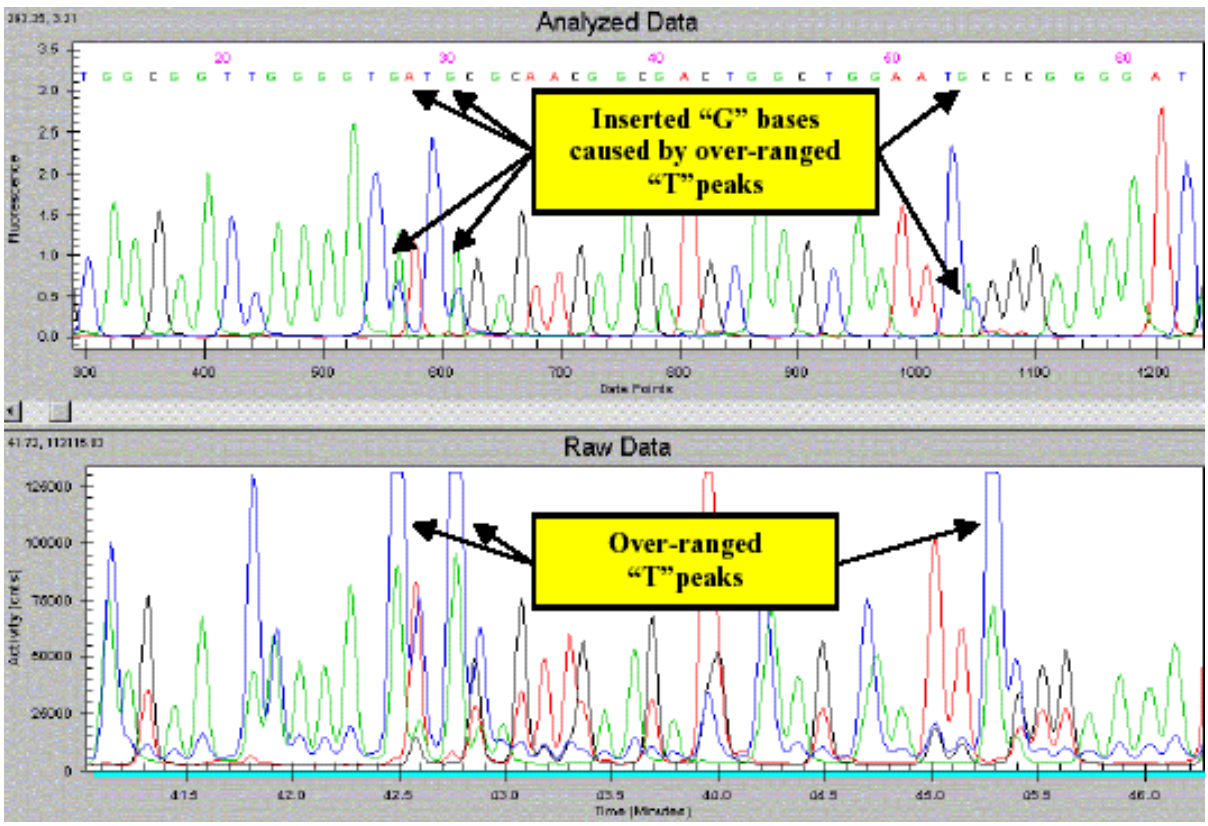
3- Vérifier le Tm de l'amorce de séquençage employée et ajuster en conséquence la température d'hybridation.

4- S'assurer de l'utilisation de tubes ou de plaques pour PCR. La plaque pour échantillons employée par le CEQ™ peut être utilisée sur les thermocycleurs MJ PTC-200 et PE 9600.

5- Vérifier le bon positionnement des capuchons, barrettes de capuchons, film ou couvercle en silicone de scellage. Si le scellage n'est pas hermétique, un phénomène d'évaporation peut se produire amenant à des modifications de la concentration du tampon du milieu réactionnel.

## 4) Données brutes de fluorescence trop élevées :

Dans certains cas, l'intensité du signal de fluorescence peut être si élevée qu'elle risque de saturer le système de détection. Cela conduit à un appel de base erroné notamment lorsque le logiciel sera amené à estimer de manière artificielle la hauteur des pics ainsi que leur position. Dans ce contexte, des extra bases sont insérées dans la séquence étudiée.
En paramétrant l'axe des ordonnées des données brutes de fluorescence à pleine échelle (137 000 cnts) et en examinant la forme des pics l'utilisateur peut déterminer si ces derniers sont saturants. Le fait que le sommet des pics soit tronqué (voir le tracé bleu dans l'exemple ci-dessous) indique que le détecteur est saturé. L'intensité de fluorescence des pics est alors trop importante.




**Insertion de bases due à des pics saturés.**

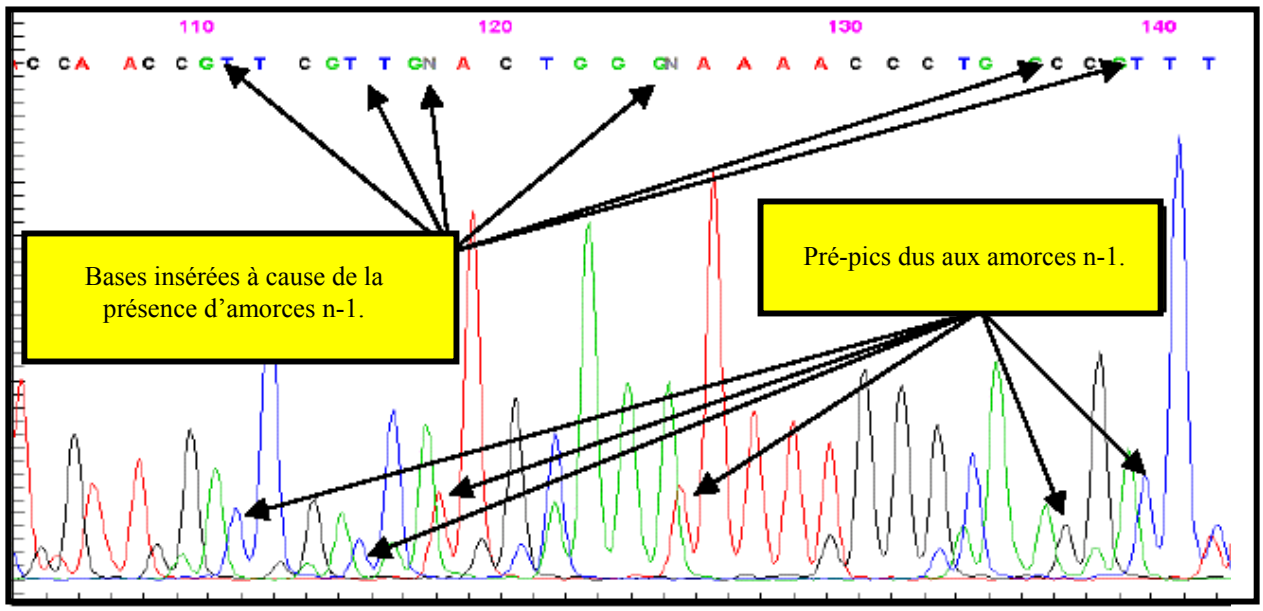
Actions correctrices :

1- Si les pics sont d'intensité trop élevée, la solution la plus simple est de refaire migrer l'échantillon en employant un temps d'injection plus court (par exemple, 30 secondes au lieu de 1 minute).
2- Employer moins de matrice ADN ou diminuer le nombre de cycle au cours du thermocyclage pour générer moins de signaux de fluorescence lors de la réaction de séquençage.

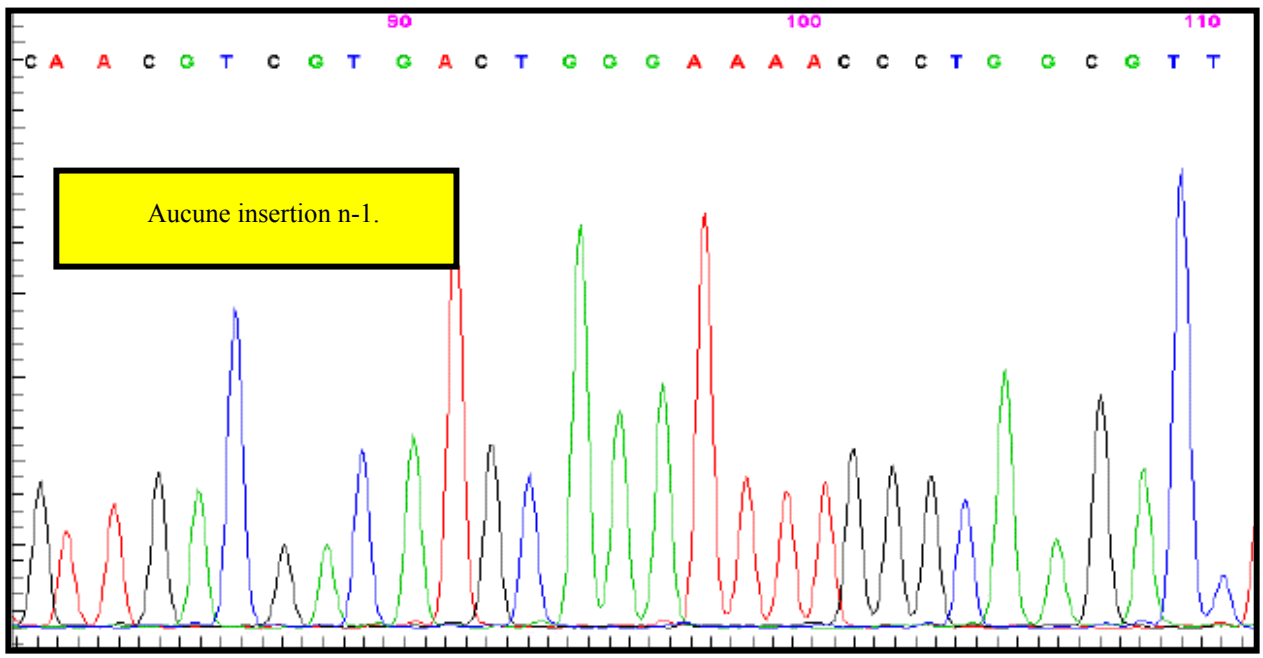
## 5) Les phénomènes d'insertion :

### a) Les insertions dues aux amorces n-1 :

La présence d'un pourcentage significatif d'amorces n-1 dans une préparation d'amorces peut entraîner l'apparition de pré-pics précédant un pic de séquence réel. Dans certains cas, ces petits pics peuvent être appelés comme de vraies bases dans la séquence. Cela se produit généralement plus souvent dans une séquence qui présente un G suivi d'un A. Toutefois, des multiplets (i.e. TT ou CC) peuvent aussi être associés à ces phénomènes d'insertion. Dans l'exemple ci-après, la présence d'une grande quantité d'amorce n-1 (~20%) associée à l'amorce employée pour le séquençage a pour conséquence l'insertion d'un pré-pic plus petit devant chaque pic réel de séquence. Comme le montre l'illustration, à plusieurs reprises ces pré-pics sont considérés comme de vraies bases et appelés en conséquence.




**Grande quantité d'amorces n-1**




**Pas d'amorces n-1**

Les caractéristiques d'incorporation de l'ADN polymérase thermostable employée dans le kit de séquençage ainsi que les caractéristiques des fluorochromes Well Red ™ peuvent être utiles pour distinguer les pré-pics des pics réels. Par exemple, lorsque deux T se succèdent le premier pic est généralement plus important. Ainsi, un petit pic de T suivi d'un grand pic de T désigne le premier pic comme étant un pré-pic ne devant pas être intégré dans la séquence étudiée.

Actions correctrices :

La seule manière de corriger ce problème est de travailler avec des amorces de séquençage de haute qualité.

1- Si vous vous fournissez auprès de services externes (service commun, société de synthèse à façon d'oligonucléotides,…) demandez au prestataire d'employer les conditions de synthèse ayant le plus important degré de qualité. Il est important de noter que les méthodes de purification d'oligonucléotides basées sur la chromatographie ne permettent pas de séparer complètement la fraction n-1 de la fraction oligonucléotide ayant la taille attendue et par conséquent ne permettent pas de « sauver » une préparation contaminée.

2- Si vous procédez vous même à la synthèse des amorces, travaillez en configuration « Haute qualité » sur le synthétiseur employé. Cela nécessite généralement d'employer de plus grandes quantités de réactifs de capping et des temps de greffage chimique plus longs. Comme mentionné précédemment, les méthodes de purification d'oligonucléotides basées sur la chromatographie ne permettent pas de séparer complètement la fraction n-1 de la fraction oligonucléotide ayant la taille attendue et par conséquent ne permettent pas de « sauver » une préparation contaminée.

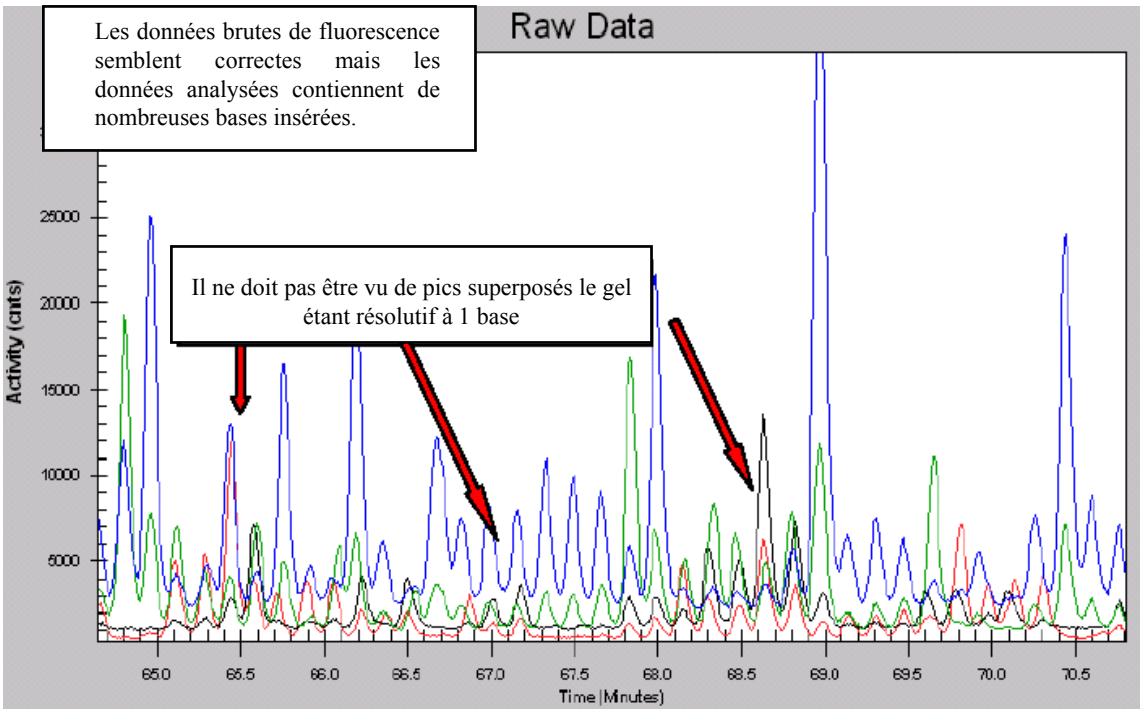
**b) Les insertions dues à un mélange de matrices, un mélange d'amorces ou un mauvais appariement d'amorce :**

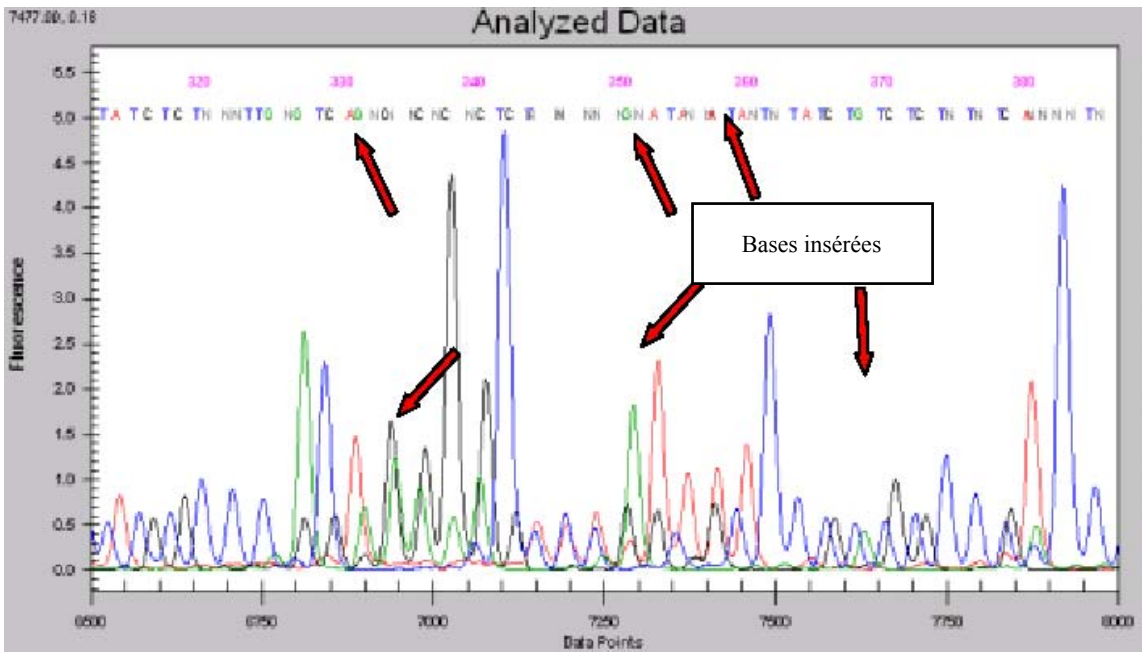
Dans bien des cas, de mauvais résultats de séquençage sont dus à plusieurs événements de séquençage se produisant en une même réaction. Les événements multiples de séquençage sont généralement dus à un mélange de matrices (2 ou plusieurs matrices ADN dans la réaction), un mélange d'amorces (en plus de l'amorce de séquençage, la réaction est initiée par l'une des amorces ayant servi à générer le produit de PCR séquencé), ou un mauvais appariement de l'amorce de séquençage (cette dernière s'hybride en 2 ou plusieurs sites sur la matrice séquencée).Tous ces événements de séquençage multiple conduisent aux mêmes symptômes : bases insérées, plus de 8 à 10 bases par minute dans les données brutes et superposition de pics tant dans les données brutes que dans les données analysées (co-migration de plus d'un fragment marqué de séquençage).

1- Lorsque plusieurs populations différentes de molécules d'ADN présentant un site commun d'hybridation pour l'amorce de séquençage sont présentes dans le milieu réactionnel, plusieurs réactions de séquençage peuvent se produire simultanément. Il est assez fréquent de récupérer une population mixte à partir d'échantillon PCR après excision sur gel (e.g. technique de differentiel display) ou à partir de PCR contenant plusieurs fragments amplifiés. Cela peut aussi se rencontrer avec des échantillons de plasmides quand, par exemple, plus d'une colonie recombinante est mise en culture. Dans ce cas, le début des données de séquence est bon (séquence commune du vecteur) mais au niveau de la région insérée, les différences entre populations se traduiront par la présence de bases insérées.

2- Le mélange d'amorces ou des amorces qui s'apparient mal sont deux phénomènes similaires dansle sens où ils vont conduire à l'insertion de bases à partir d'événements multiples d'extension d'amorce se produisant dans le même milieu réactionnel. Dans le premier cas, la totalité des amorces employées pour générer le produit de PCR n'a pas été complètement éliminée avant de procéder à la réaction de séquençage. Ainsi, les amorces résiduelles initient des réactions de séquence à partir de régions différentes sur la matrice.

3- S'il existe 2 voire plusieurs site d'hybridation pour l'amorce sur la matrice étudiée, l'amorce de séquençage ne va pas s'apparier correctement. La conséquence est l'existence d'un excès de bases dans les données analysées qui génère l'insertion de bases dans la séquence finale. Dans bien des cas, les données présentent tellement d'insertion que l'analyse échoue.
L'exemple ci-dessous montre un exemple d'insertion de bases ayant pour origine une matrice contaminée.



Actions correctrices :

1- Préparer la matrice ADN de manière à éviter la présence de plusieurs matrices.

2- Dans bien des cas, lorsque la matrice contaminante est présente en très faible quantité, le simple fait de diluer l'échantillon contribuera à diminuer la proportion de séquence contaminante permettant d'obtenir une séquence correcte.

3- Purifier les produits de PCR avant de procéder à leur séquençage.

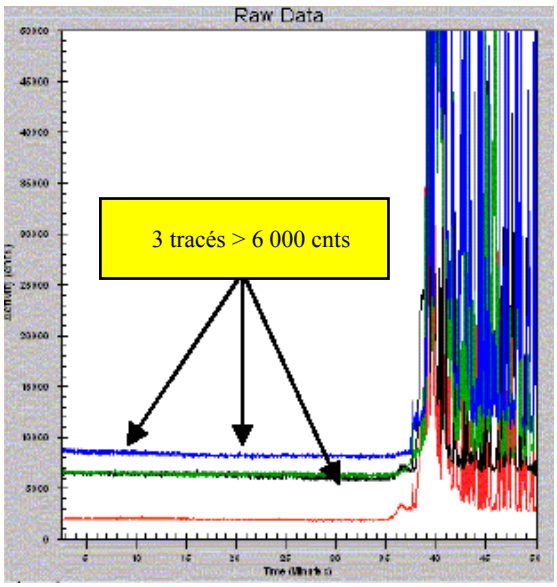
4- employer de préférence des amorces qui s'hybrident en un site interne au produit de PCR séquencé (amorces nichées).

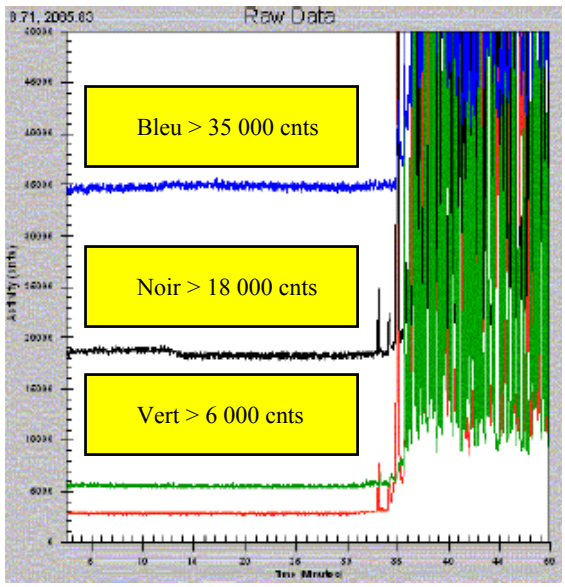
5- Sélectionner des températures d'hybridation qui limitent les mauvais appariements.

6- Les régions ne présentant aucune ambiguïté de séquence seront privilégiées pour choisir les sites d'hybridation de l'amorce de séquençage.

## 6) Bruit de fond élevé :

Une ligne de base élevée peut conduire à un appel de bases incorrect ainsi qu'à des longueurs de lecture faibles. Les performances optimum du système de détection du CEQ™ sont atteintes lorsque la ligne de bases pour les 4 canaux (bleu, vert, noir et rouge) est inférieure à 6 000 cnts.
La figure ci-après montre un exemple de capillaires sales. Les résultats de gauche sont associés à des données de qualité acceptable, l'exemple de droite montre un cas extrême de capillaires sales.




Actions correctrices :

1- Retirer le jeu de capillaires et procéder au nettoyage de la fenêtre de détection. Pour ce faire, employer de l'eau stérile. **Ne pas utiliser de méthanol**. Nettoyer avec un coton tige dans une seule direction.

2- Dans la fonction de contrôle direct (Direct Control) du module de Run, procéder à une purge du collecteur (Manifold Purge) et remplir les capillaires avec du gel (Fill Capillaries) avant de procéder à leur nettoyage (voir recommandation 1- ci-dessus).

# Section III : Tableau d'aide rapide au diagnostic

| Problème rencontré | Profil données brutes & courant | Origine probable du problème | SOLUTIONS EVENTUELLES |
|---|---|---|---|
| ➢ **Non reproductibilité**<br>➢ **Faible longueur de lecture**<br>➢ **Appel de base imprécis**<br>➢ **Données non analysées** | **Signal brut faible et profil de courant normal** | ✓ Pas assez d'ADN<br>✓ Mauvais thermocyclage Problème avec le thermocycleur<br>✓ Mauvaise formamide<br>✓ Concentration d'amorce incorrecte<br>✓ Resuspension insuffisante du culot dans le SLS<br>✓ Problème au moment de la purification des réactions de séquence<br>✓ Huile minérale incorrecte<br>✓ Oubli de l'huile minérale | ✓ Augmenter la concentration d'ADN, toujours quantifier la matrice<br>✓ Vérifier la concentration d'amorce<br>✓ Vérifier que le culot est bien remis en suspension dans le SLS<br>ou<br>si le contrôle pUC18 n'atteint pas les spécifications :<br>✓ Employer le SLS fourni dans le kit pour la remise en suspension<br>✓ Contrôler le thermocycleur<br>✓ Vérifier que les bonnes conditions de thermocyclage ont été employées sur le thermocycleur<br>✓problème de précipitation éthanol :<br>• S'assurer que le glycogène est bien ajouté<br>• Centrifuger à +4°C<br>• Vérifier le pH de NaAc<br>• Vérifier la concentration de l'EDTA<br>• S'assurer de l'ajout de l'huile minérale après la purification |
| | **Signal brut faible et profil de courant irrégulier ou en chute** | ✓ Le prétraitement des plasmides à la chaleur n'a pas été réalisé (échantillons de plasmides, cosmides, YAC, BAC ou PAC)<br>✓ Le préchauffage a été réalisé en présence de tous les éléments de la réaction de séquençage<br>✓ L'étape de préchauffage a été incluse au début du programme de cyclage<br>✓ Trop d'ADN été déposé dans les capillaires<br>✓ Les échantillons sont associés à des ions contaminants qui sont co-injectés dans les capillaires (ions issus de sels contaminants ou de la dégradation de la formamide)<br>✓ emploi d'une méthode incorrecte de purification de la matrice séquencée (e.g. CsCl, phénol-chloroforme) ou élimination incomplète de l'éthanol lors de la préparation des échantillons, etc… | ✓ Préchauffer tous les échantillons plasmidiques (pour la procédure à suivre, se référer à la page 17 du protocole détaillé de séquençage ainsi qu'à la note d'application A-1872A)<br>✓ Ne préchauffer **que** l'ADN à séquencer contenu dans de l'eau<br>✓ Ajouter une étape supplémentaire dans le programme de cyclage n'est pas préconisé<br>✓ Diminuer les quantités d'Adn (suivre les recommandations du protocole)<br>✓ Vérifier la méthode employée de purification de la matrice<br>✓ Employer le SLS fourni dans le kit de séquençage. |

| Problème rencontré | Profil données brutes & courant | Origine probable du problème | SOLUTIONS EVENTUELLES |
|---|---|---|---|
| ➢ **Non reproductibilité**<br>➢ **Faible longueur de lecture**<br>➢ **Appel de base imprécis**<br>➢ **Données non analysées** | **Aucun signal mais un profil de courant normal**<br><br>**(aucun signal même de terminateurs marqués non incorporés)** | ✓ Perte du culot d'ADN<br>✓ L'extrémité des capillaires est cassée<br>✓ Les ddNTPs n'ont pas été ajoutés (dans le cas du kit réf. 608000)<br>✓ Les échantillons n'ont pas été remis en suspension dans la formamide ou le SLS<br>✓ Pas assez d'échantillon dans le puits | ✓ Utiliser des embouts de pipettes dédiés aux dépôts sur gel pour éliminer plus efficacement l'éthanol lors de la purification de la réaction de séquence<br>✓ Changer le jeu de capillaires si les extrémités sont cassées<br>✓ Vérifier que tous les réactifs ont bien été mis en présence<br>✓ N'utiliser que le SLS fourni dans le kit pour la remise en suspension<br>✓ Employer au moins 30 µl de SLS pour re-suspendre les échantillons |
| | **Seul le signal des terminateurs marqués non incorporés est visible associé à un profil de courant normal** | ✓ La réaction enzymatique ne s'est pas faite<br>✓ L'amorce employée n'est pas adaptée<br>✓ Mauvaise température d'hybridation<br>✓ Un des réactifs manque (dans le cas du kit réf. 608000)<br>✓ Thermocycleur employé hors service | ✓ Vérifier que tous les réactifs aient été mis en présence<br>✓ Vérifier le Tm de l'amorce de séquençage et ajuster en fonction la température d'hybridation<br>✓ Vérifier le programme de cyclage employé ainsi que les phases d'ajustement de température<br>✓ Contrôler le thermocycleur |
| | **Aucun signal et un mauvais profil de courant** | Voir plus haut les explications sur les profils de courant défectueux | |
| | **Aucun signal et un mauvais profil de courant (irrégulier ou en chute) identique :**<br><br>➢ **dans les 8 capillaires** | ✓ Présence de bulles d'air qui se sont formées dans le collecteur<br>✓ La zone du collecteur est sale ne permettant pas un contact hermétique avec le capillaire<br>✓ Le courant peut être perturbé dans les 8 capillaires s'il n'y pas suffisamment de tampon dans la plaque de tampon | ✓ Procéder à 2 purges du collecteur puis 2 remplissages du capillaire avec du gel (note : employer une nouvelle plaque de tampon)<br>✓ Nettoyer la zone du collecteur au niveau de l'appareil<br>✓ Remplir les puits de la plaque de tampon au moins au ¾ |
| | ➢ **dans 1 seul capillaire pour le même échantillon** | ✓ Présence de bulles d'air dans le puits de l'échantillon | ✓ Vérifier l'absence de bulles d'air au niveau de la plaque d'échantillons avant de la charger sur le CEQ™ |

| Problème rencontré | Profil données brutes & courant | Origine probable du problème | SOLUTIONS EVENTUELLES |
|---|---|---|---|
| ➢ **Non reproductibilité**<br>➢ **Faible longueur de lecture**<br>➢ **Appel de base imprécis**<br>➢ **Données non analysées** | **Saut de la ligne de base des données brutes** | ✓ Présence d'éléments de contamination au niveau de l'échantillon ayant pour origine :<br>- sels<br>- amorces impures | ✓ Eluer la matrice ADN dans de l'eau stérile ou dans une solution Tris 10 mM pH 8,5<br>✓ Ne pas utiliser un tampon à force ionique élevée pour l'élution de l'ADN lors de la purification de la matrice<br>✓ Employer des amorces purifiées HPLC<br>✓ Utiliser la bonne concentration d'amorce<br>✓ Eviter l'ajout de sels de quelque nature que ce soit dans l'échantillon |
| ➢ **Fort signal de données brutes mais appel incorrect des bases ; présence de bases insérées** | **Données brutes de fluorescence saturées et associées à un profil de courant normal** | ✓ Trop de cycle pour la réaction de séquençage<br>✓ Conditions de thermocyclage très efficaces entraînant des signaux qui saturent le détecteur<br>✓ Mauvaise qualité de l'amorce (n-1)<br>✓ Amorce dégradée | ✓ Ré-injecter l'échantillon avec un temps moindre<br>✓ Diminuer le nombre de cycle sur le thermocycleur<br>✓ Améliorer la qualité de synthèse des amorces employées pour le séquençage |
| ➢ **Effets de la formamide** | ➢ **Perte des fluorophores**<br>➢ **Diminution générale de l'intensité de signal**<br>➢ **Aucun signal**<br>➢ **et/ou problème de courant** | ✓ La formamide se dégrade en acide formique et en ammoniaque. Ces produits ioniques de dégradation entrent en compétition de manière significative avec les échantillons d'ADN au moment de l'injection électrocinétique entraînant une baisse de l'intensité de signal. De plus, ils peuvent causer la dégradation de l'échantillon lui même | ✓ Utiliser le SLS pour la remise en suspension<br>✓ Stocker et employer le SLS correctement<br>✓ Dé-ioniser correctement la formamide si elle est préparée au laboratoire |
| ➢ **Artéfacts liés à l'amorce** | ➢ **Les données analysées contiennent de nombreuses base insérées**<br>➢ **Présence de pics superposés en données brutes ainsi qu'en données analysées**<br>➢ **Plus de 9 bases par minute en données brutes** | ✓ Mauvais appariement<br>✓ Mélange de matrices<br>✓ Amorce de mauvaise qualité | ✓ Sélectionner une température d'hybridation qui limite les hybridations non spécifiques<br>✓ Employer des régions de séquence sans ambiguïté pour choisir le site d'hybridation de l'amorce de séquençage<br>✓ Préparer la matrice ADN en évitant soigneusement les contaminations par d'autres matrices<br>✓ Dans le cas des produits de PCR, employer préférentiellement un site interne d'hybridation pour l'amorce de séquençage<br>✓ Dans la plupart des cas, l'espèce contaminante est présente en faible quantité et une simple dilution de la matrice permettra de diminuer sa concentration et de limiter ainsi ses effets |

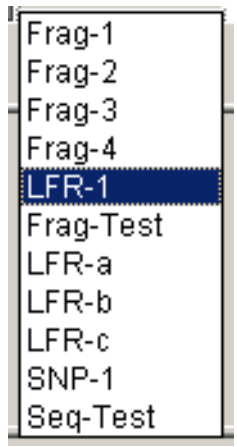
| Problème rencontré | Profil données brutes & courant | Origine probable du problème | SOLUTIONS EVENTUELLES |
|---|---|---|---|
| ➢ **Mobilité des sels** | **Compression des données dans la région située entre 20 et 70 bases de l'extrémité de l'amorce** | ✓ Due à la migration des sels présents dans le tampon de séparation | ✓ Uniquement observé en version logicielle v.1.1<br>✓ Phénomène non rencontré en version 2.x et supérieure |
| ➢ **Mauvaise résolution** | **Vérifier la précision d'appel des bases avec la matrice contrôle pUC18** | ✓ Mauvais thermocyclage<br>✓ Mauvaise formamide<br>✓ Problème lors de la purification des réactions de séquence<br>✓ Huile minérale incorrecte<br>✓ Incrimination du jeu de capillaires<br>✓ Incrimination du gel de séparation | ✓ Vérifier si le contrôle pUC18 atteint les spécifications. Si c'est le cas les éléments suspects sont la matrice ADN séquencée ou l'amorce employée.<br>✓ Si le contrôle pUC18 n'atteint pas les spécifications :<br>➢ Employer le SLS pour remettre en suspension les échantillons purifiés<br>➢ Vérifier le thermocycleur<br>➢ Problème lors de la précipitation éthanol :<br>• Vérifier la présence de glycogène<br>• Centrifuger à +4°C<br>• Contrôler le pH du NaAc<br>• Contrôler la concentration de l'EDTA<br>• Vérifier que l'huile minérale a été ajoutée<br>• Contrôler la durée de vie des capillaires<br>• Contrôler la durée de vie du gel |
| ➢ **Capillaires** | ➢ **La résolution n'est pas bonne**<br>➢ **Moins de 6 pics par minute**<br>➢ **Présence de pics douteux**<br>➢ **Début retardé des données malgré un profil normal de courant** | ✓ Le jeu de capillaires a plus de 150 migrations à son actif<br>✓ Le revêtement interne du capillaire est endommagé<br>✓ L'extrémité des capillaires s'est desséchée<br>✓ Le jeu de capillaires n'a pas été stocké correctement<br>✓ Certains composés chimiques ont été employés avec l'échantillon et ont endommagé les capillaires (e.g. DMSO)<br>✓ La plaque de tampon mise en présence ne correspond pas au plan de la plaque d'échantillons | ✓ Remplacer le jeu de capillaires |
| | ➢ **Un (ou plus) des 4 tracés sont supérieurs à 6 000 cnts au début de la migration** | ✓ Fenêtre de détection sale<br>✓ Collecteur sale | ✓ Retirer le jeu de capillaires et nettoyer la fenêtre de détection. Employer pour cela de l'eau stérile ou de l'éthanol absolu. Ne pas utiliser de méthanol. Nettoyer la fenêtre de détection dans une seule direction<br>✓ Nettoyer la zone du collecteur |

# Section IV : En résumé

## 1) Les méthodes de séparation disponibles sur le système CEQ™ :

• Séquençage :

- ➢ LFR-1 = 700 nt
- ➢ LFR-a = > 800 nt
- ➢ LFR-b = 600 nt
- ➢ LFR-c = 500 nt
- ➢ Seq-Test = à n'utiliser que lors de la séparation de l'échantillon test pUC18 (réf. 608070).




• Analyse de fragments :

- ➢ Frag1
- ➢ Frag2
- ➢ Frag3 = migration de fragments jusqu'à 400 nt
- ➢ Frag4 = migration de fragments jusqu'à 600 nt
- ➢ SNP-1 = analyse de SNP
- ➢ Frag-Test = à n'utiliser que lors de la séparation de l'échantillon test fragments (réf. 608105).

## 2) Les outils pour diagnostiquer les problèmes :

• L'échantillon test (réf. 608070) permet de vérifier :

- – l'instrument,
- – le gel employé,
- – le jeu de capillaires utilisé.

• Le contrôle pUC18 et son amorce de séquençage -47M13 (inclus dans chaque kit de séquençage – réf. 608000 et 608120) permettent de vérifier :

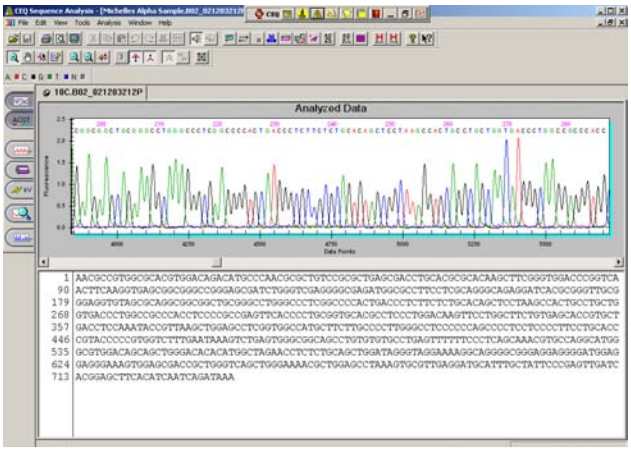
- – les réactifs employés au laboratoire,
- – la technique.

• Les échantillons propres à l'utilisateur permettent d'estimer l'implication de l'ADN (matrice) et de l'amorce dans la qualité des résultats.

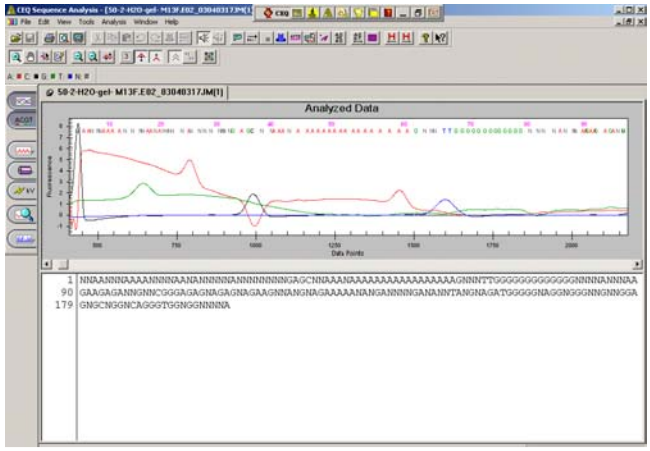
☛ Dans tous les cas, les contrôles doivent atteindre les spécifications suivantes :

précision > 98% à 700 pb (2% N) après alignement avec pUC18dG

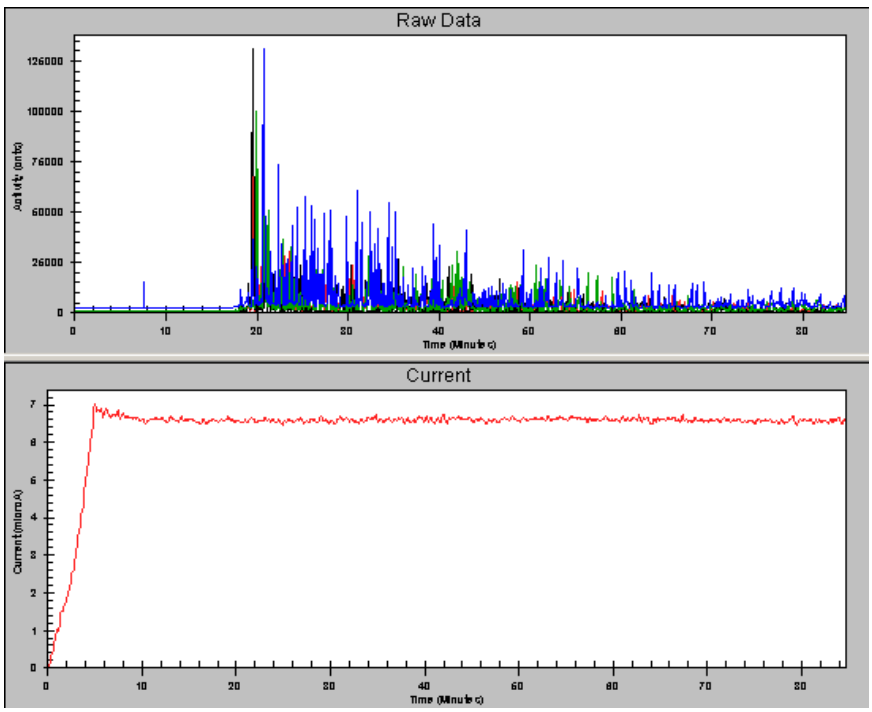
## 3) Aspect des chromatogrammes :




Aspect normal




Aspect anormal




Profil attendu de données brutes et de courant avec la méthode de séparation LFR-1

## A- PROBLEMES DE COURANT

Le système CEQ™ dépose les échantillons dans les capillaires par injection électrocinétique :

**ATTENTION** : toutes les molécules chargées négativement seront déposées dans les capillaires. Cela concerne :

☛ L'ADN : produits de la réaction de séquençage,

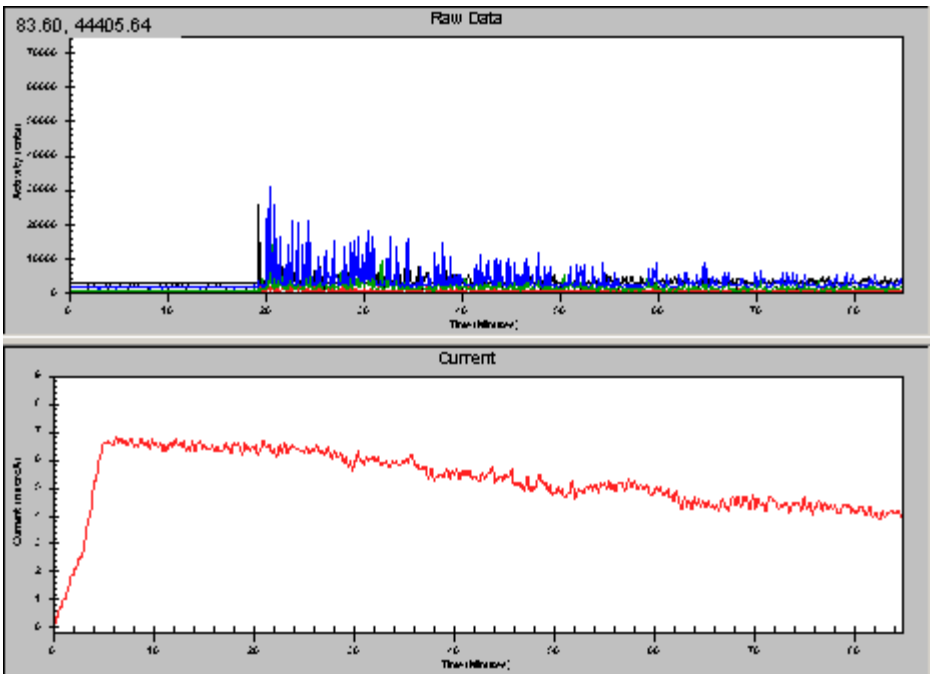
☛ L'ADN : matrice,

☛ L'ARN,

☛ Les protéines,

☛ Les sels.

### 1) Un courant qui décroît graduellement associé à des longueurs de lecture diminuées :




**CAUSES :**

☛ Présence d'un excès d'ADN super-enroulé.

**REMEDES :**

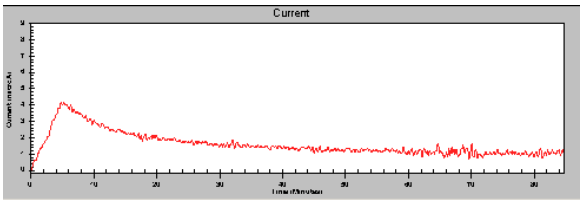
- Diminuer le temps d'injection.

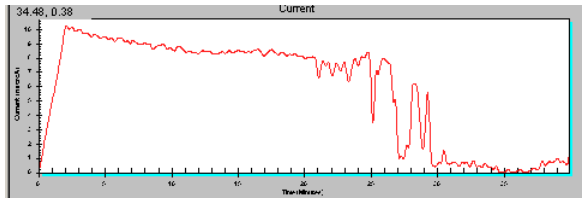
- Réduire la concentration de matrice.

- Faire un pré-traitement de la matrice par chauffage (+96°C pendant 1 minute).

## 2) Un courant qui chute :

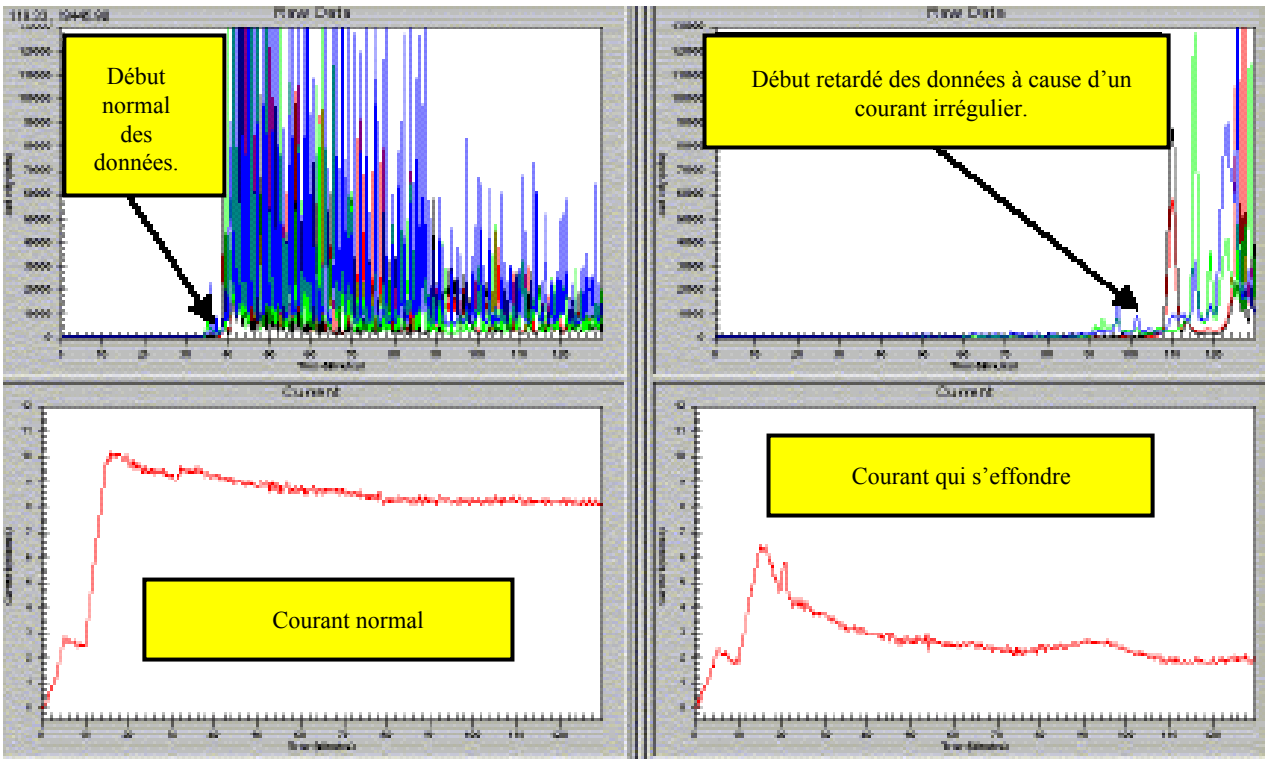
Exemple de profils pouvant être rencontrés :




Ces profils de courants sont associés à :

- des lectures courtes ou une analyse qui échoue,
- un appel imprécis de bases.




50 fmol de matrice préchauffée pendant 1 minute à +96°C

50 fmol de matrice non préchauffée

**REMEDES :**

☛ Diminuer la concentration de la matrice.

☛ Faire un préchauffage de la matrice : 1 minute à +96°C.

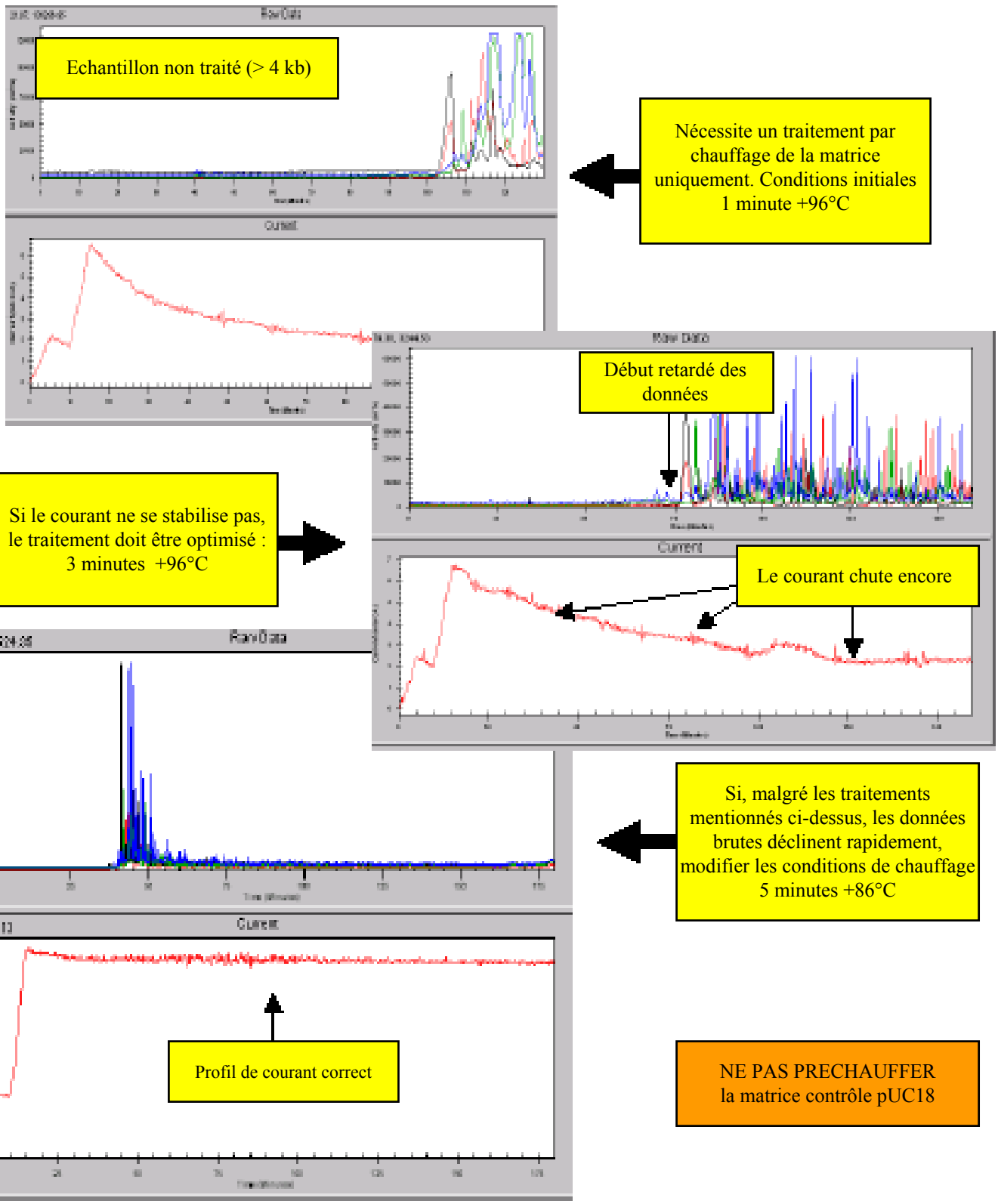
☛ Cliver la matrice : emploi d'une endonucléase de restriction.

☛ Eliminer la matrice après la réaction de séquençage : emploi de billes magnétiques.

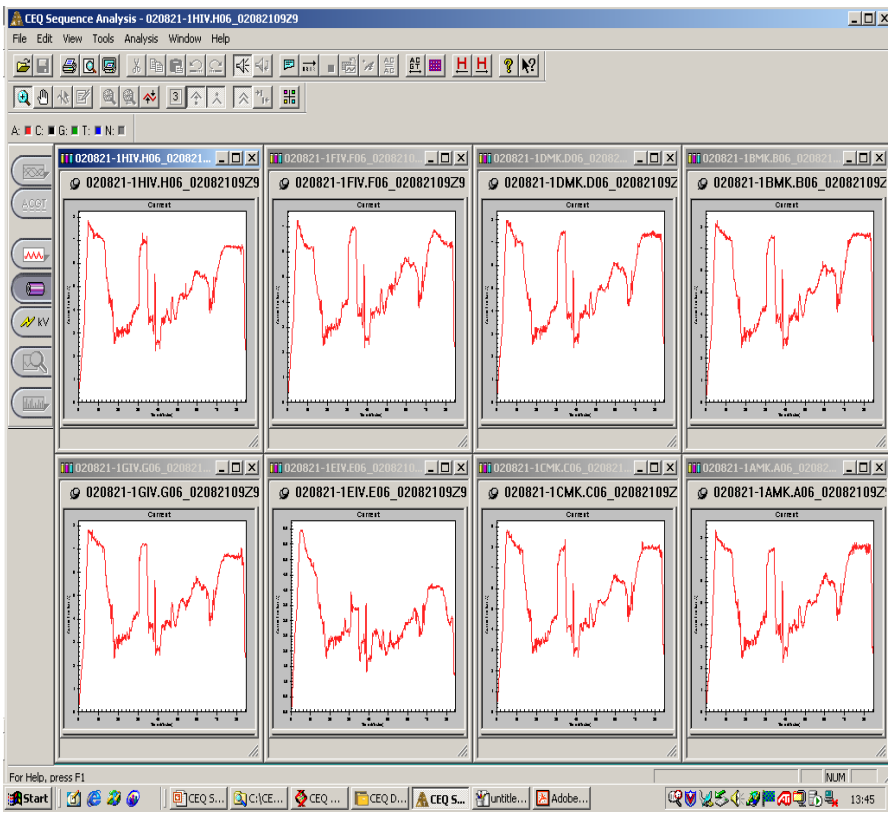
Comment optimiser le pré-traitement de la matrice par chauffage ?

Dans un premier temps essayer 1, 2 puis 3 minutes à +96°C.

Si aucune amélioration n'est observée, appliquer 5 minutes à +86°C.


Echantillon non traité (> 4 kb)
Nécessite un traitement par chauffage de la matrice uniquement. Conditions initiales 1 minute +96°C
Début retardé des données
Si le courant ne se stabilise pas, le traitement doit être optimisé : 3 minutes +96°C
Le courant chute encore
Si, malgré les traitements mentionnés ci-dessus, les données brutes déclinent rapidement, modifier les conditions de chauffage 5 minutes +86°C
Profil de courant correct
NE PAS PRECHAUFFER la matrice contrôle pUC18

## 3) Un courant qui chute de manière identique dans les 8 capillaires :




**CAUSES :**

☛ Présence de bulles d'air dans le collecteur.

**REMEDES :**

- Procéder à une purge du colleteur puis refaire migrer l'échantillon.

**ATTENTION A LA DEGRADATION DU GEL**

- Pas plus de 72 heures sur le CEQ™.

- Conservation à +4°C entre 8 et 12 mois.

## B- PROBLEMES DE DONNEES BRUTES

Les différents types de problèmes pouvant être rencontrés sont les suivants :

☛ Bruit de fond important :

- Diminue la sensibilité surtout si les signaux sont faibles.

☛ Signaux bruts trop faibles :

- Lecture courte ou absence de lecture
- Le rapport minimum signal/bruit doit être 3:1

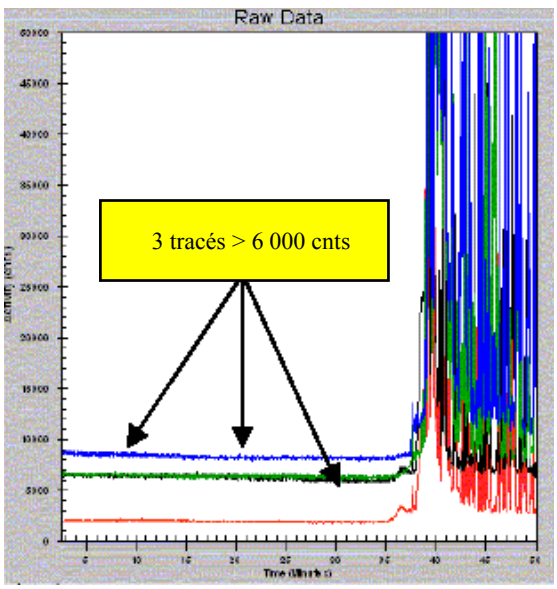
☛ Signaux bruts trop importants :

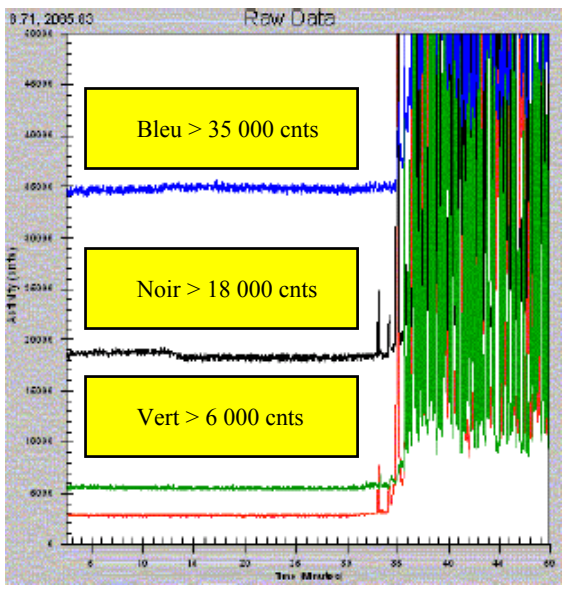
- Source d'erreur lors de l'appel des bases

☛ Trop de pics :

- Reflète souvent la présence de plusieurs séquences dans un même échantillon

### 1) Bruit de fond important :



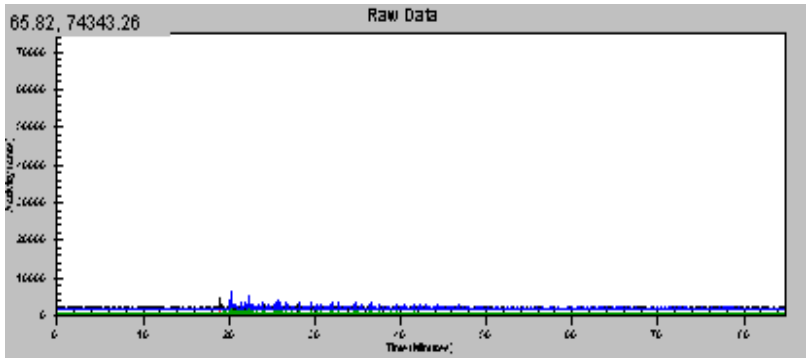




Si la ligne de base est supérieure à 6 000 cnts ou RFU (Relative Fluorescence Unit) nettoyer la fenêtre de détection en employant l'une des solutions suivantes :

- eau milliQ,
- éthanol 70%,
- soufflage d'air.

## 2) Données brutes de fluorescence trop faibles :

### i) Pas de signal et absence de pic de terminateurs marqués :

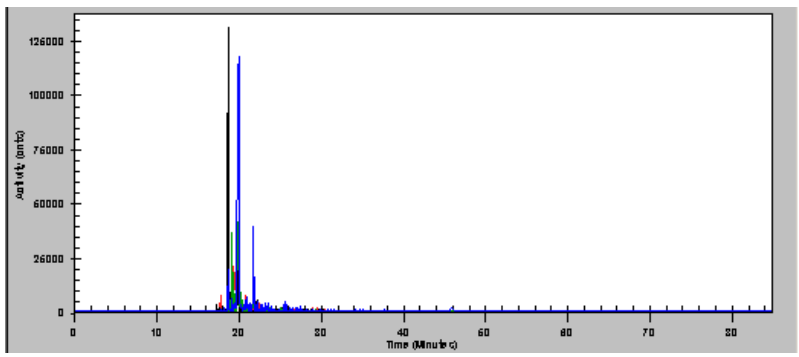



**CAUSES :**

☛ Perte du culot dans le cas d'une précipitation à l'éthanol.

☛ Dégradation des fluorochromes.

### ii) Pas de signal mais présence du pic de terminateurs marqués :




**CAUSES :**

**☛ Problème lié à la chimie :**

- Concentration d'ADN inadaptée.
- Présence de sels dans l'échantillon.
- Problèmes liés à l'amorce :
  - Conception.
  - Qualité.
- Présence d'inhibiteurs de la polymérase.
- Dégradation des fluorochromes.

**☛ Problème lié aux matériels employés :**

- Thermocycleur.
- Centrifugeuse.
- CEQ™.

## ☛ Problème lié à la chimie :

### a) La concentration d'ADN est inadaptée :

S'il y a trop peu de matrice la réaction de séquençage génère trop peu de produits.

**REMEDE :** ajouter plus d'ADN dans la réaction.

La **concentration correcte** d'ADN à mettre en présence dans la réaction de séquence est de :

- 50 – 100 fmoles pour l'ADN double brin
- 25 – 50 fmoles pour l'ADN simple brin
- 10 – 50 fmoles pour les produits de PCR

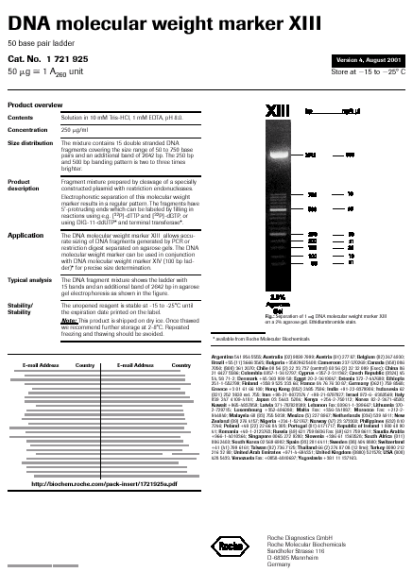
**Table de quantification pour la matrice ADN**

| Size (kilobase pairs) | ng for 25 fmol | ng for 50 fmol | ng for 100 fmol |
|---|---|---|---|
| 0.2 | 3.3 | 6.5 | 13 |
| 0.3 | 4.9 | 9.8 | 20 |
| 0.4 | 6.5 | 13 | 26 |
| 0.5 | 8.1 | 16 | 33 |
| 1.0 | 16 | 33 | 65 |
| 2.0 | 33 | 65 | 130 |
| 3.0 | 50 | 100 | 195 |
| 4.0 | 65 | 130 | 260 |
| 5.0 | 80 | 165 | 325 |
| 6.0 | 100 | 195 | 390 |
| 8.0 | 130 | 260 | 520 |
| 10.0 | 165 | 325 | 650 |
| 12.0 | 195 | 390 | 780 |
| 14.0 | 230 | 455 | 910 |
| 16.0 | 260 | 520 | 1040 |
| 18.0 | 295 | 585 | 1170 |
| 20.0 | 325 | 650 | 1300 |
| 48.5 | 790 | 1500* | 1500* |

For ssDNA, the values (ng) should be divided by 2.
*Use no more than 1.5 µg of template DNA.

Comment estimer la concentration de la matrice ?

- Migration sur gel d'agarose avec marqueur de poids moléculaire (voir ci-contre).
- Lecture en fluorescence (e.g. kit *picogreen*).
- Lecture en spectrophotométrie.


DNA molecular weight marker XIII

50 base pair ladder

Cat. No. 1 721 925

50 µg = 1 $A_{260}$ unit

Version 4, August 2001

Store at –15 to –25° C

Product overview

Contents

Concentration

Size distribution

Product description

Application

Typical analysis

Stability/ Stability

XIII

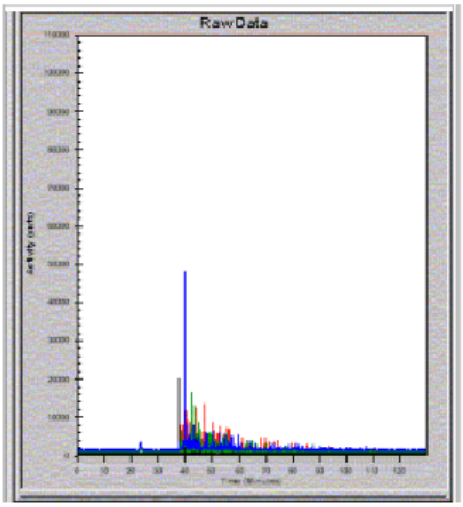
2.5% Agarose Gel

http://biochem.roche.com/pack-insert/1721925e.pdf

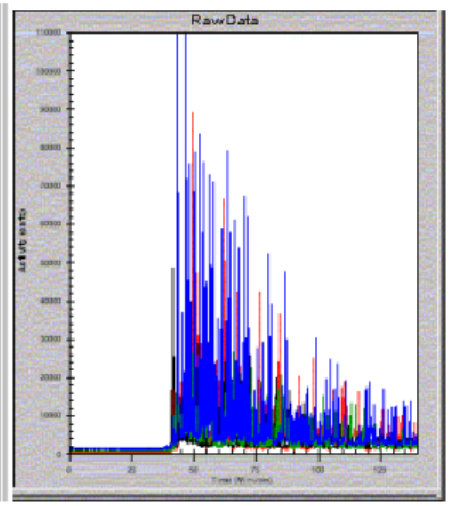
Roche Diagnostics GmbH
Roche Molecular Biochemicals
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

b) Présence de sels dans la matrice ou l'amorce :

Ces sels entrent en compétition lors de l'injection électrocinétique.




Réaction de séquence associée à des sels




Réaction de séquence sans impureté

**REMEDES :**

- Diminuer la quantité de matrice.
- Purifier la matrice.
- Refaire synthétiser l'amorce.

c) Problèmes liés à l'amorce :

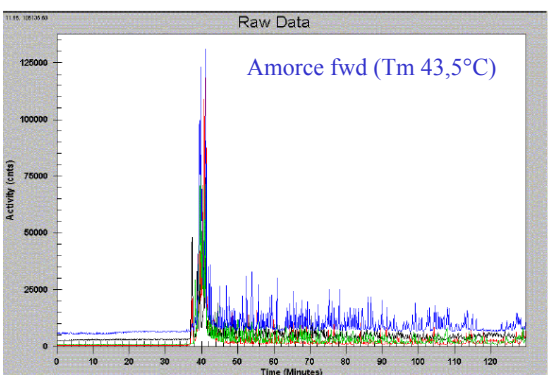
❶ La conception de l'amorce (design) :

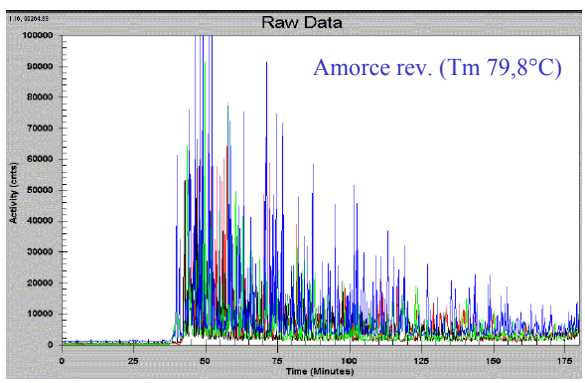
☛ l'amorce idéale présente les caractéristiques suivantes :

➘ longueur : 22 à 25 pb,

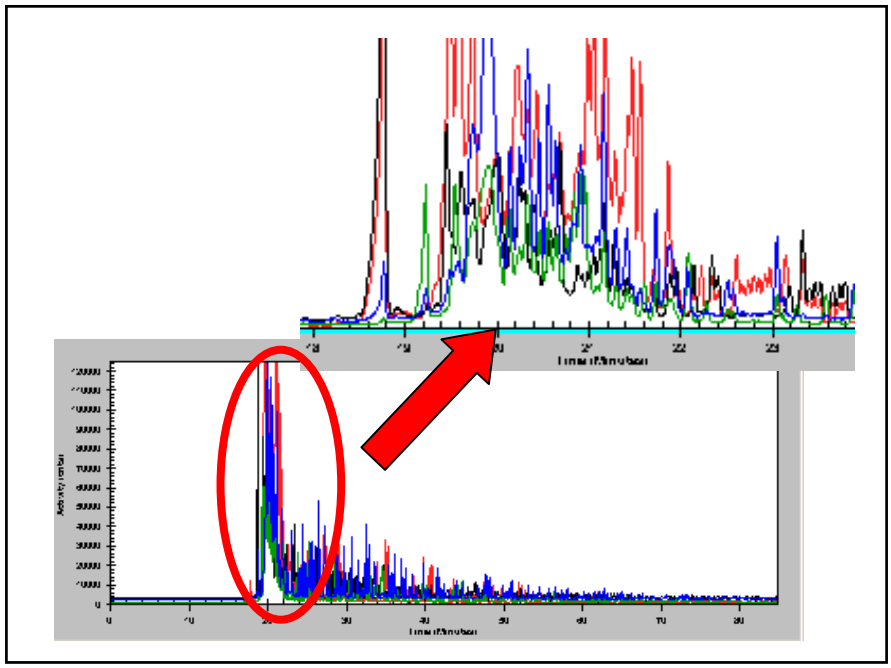
➘ contenu en GC : 50%,

➘ Tm > 55°C (température d'hybridation + 5°C).




**Influence du Tm**



**Influences des interactions d'amorces (structures en épingle à cheveux, dimérisation)**

❷ La qualité de l'amorce :

➢ Dégradation des amorces :

- Éviter de trop congeler et dégeler l'amorce.
- Stocker dans de l'eau milliQ ou dans du Tris 10 mM.

➢ Synthèse de mauvaise qualité :

- Vérifier l'intégrité de l'amorce en HPLC ou en électrophorèse capillaire.

➢ Purification insuffisante :

- Utiliser au minimum des amorces dessalées.

❸ Les conditions de thermocyclage :

➢ Le nombre de cycle.

➢ La température d'hybridation.

d) Présence d'inhibiteurs de la polymérase :

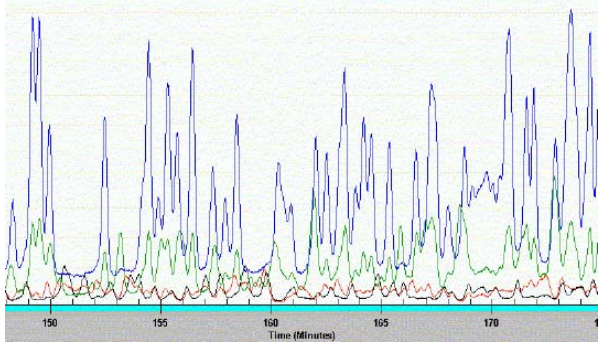
Ils sont de différente nature : DEPC, Phénol, EDTA, protéines se liant à l'ADN, etc…

✒ Penser à purifier la matrice (emploi de colonnes de filtration,…).

✒ Stocker convenablement les amorces de séquençage (eau ou Tris).

e) Dégradation des fluorochromes :

De manière typique, les fluorochromes rouge et noir se dégradent les premiers.




Les marqueurs sont stables dans le tampon de la réaction de séquençage ainsi que dans le SLS recouvert d'une goutte d'huile.

Les différentes causes d'une dégradation des fluorophores sont :

☛ Emploi d'une mauvaise formamide ou d'un SLS incorrectement conservé :

• Utiliser le SLS fourni dans le kit ou disponible sous la référence 608082.

• Ne pas dégeler et recongeler successivement le SLS. Nous recommandons d'aliquoter le SLS dès sa première utilisation.

☛ Les culots ont été chauffés pour les sécher après la précipitation à l'éthanol :

• Sécher les culots sous vide ou à l'air mais SANS CHAUFFER.

☛ Oubli de recouvrir d'une goutte d'huile les échantillons re-suspendus en SLS :

• L'huile minérale a un double rôle protecteur : protection contre l'oxydation des fluorochromes et protection contre l'évaporation lors de la dénaturation des échantillons par le CEQ™.

**☛ Problème lié aux instruments :**

a) Thermocycleur :

➢ Utiliser un appareil à couvercle chauffant.

➢ Eviter l'évaporation avec bouchons et tapis de scellage.

➢ Vérifier la fonctionnalité du thermocycleur.

b) Centrifugeuse :

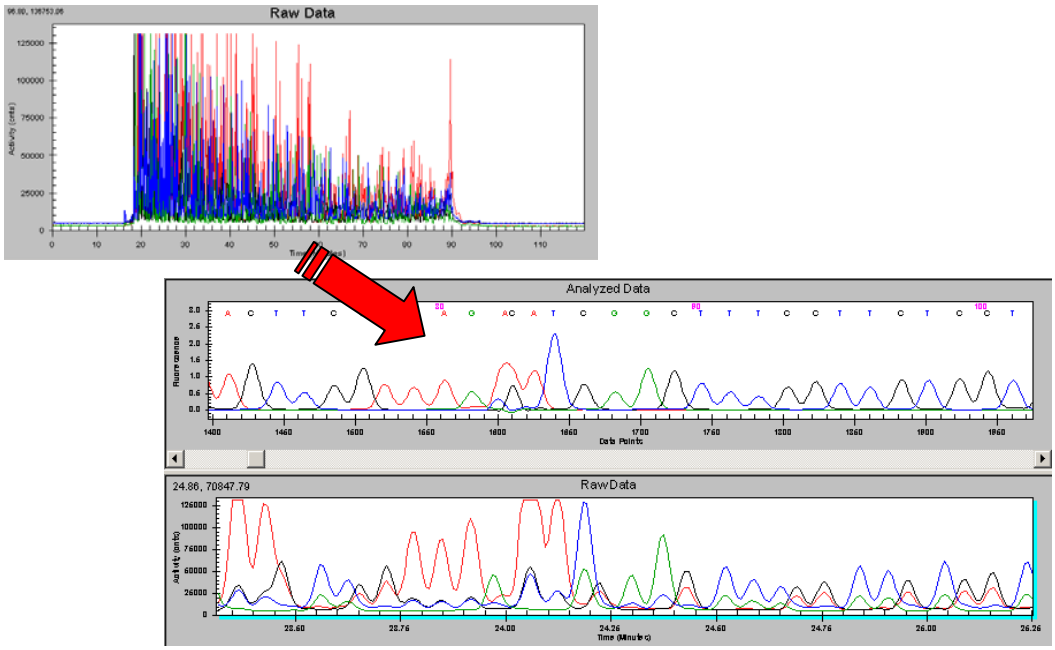
➢ Employer une centrifugeuse réfrigérée pour la purification à l'éthanol des réactions de séquence.

➢ Pour les plaques appliquer une force > 1000 g et pour les tubes > 10 000 g.

c) CEQ™ :

➢ Procéder aux vérifications avec l'échantillon test : résolution et précision de lecture, capillaires et gel.

## 3) Données brutes de fluorescence trop importantes :

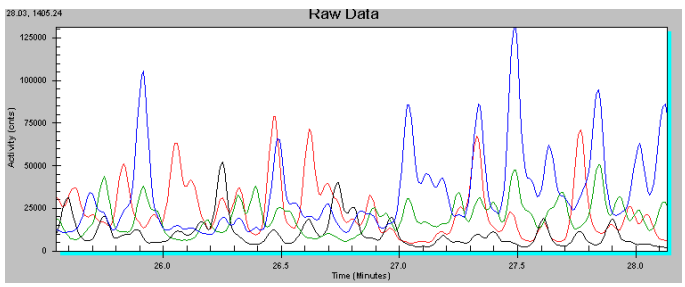



**REMEDES :**

- Réduire l'injection des échantillons.
- Diminuer la concentration de matrice ADN.
- Réduire le nombre de cycle.
- Vérifier la concentration de la matrice avant de lancer les réactions de séquençage.

## 4) Trop de pics : les phénomènes de contamination.

### a) Contamination de la matrice :




❶ Plasmides :

Plusieurs colonies ont été piquées et cultivées.

**REMEDES :**

- Prélever une autre colonie.
- Etaler à nouveau sur boite.

❷ Produits de PCR :

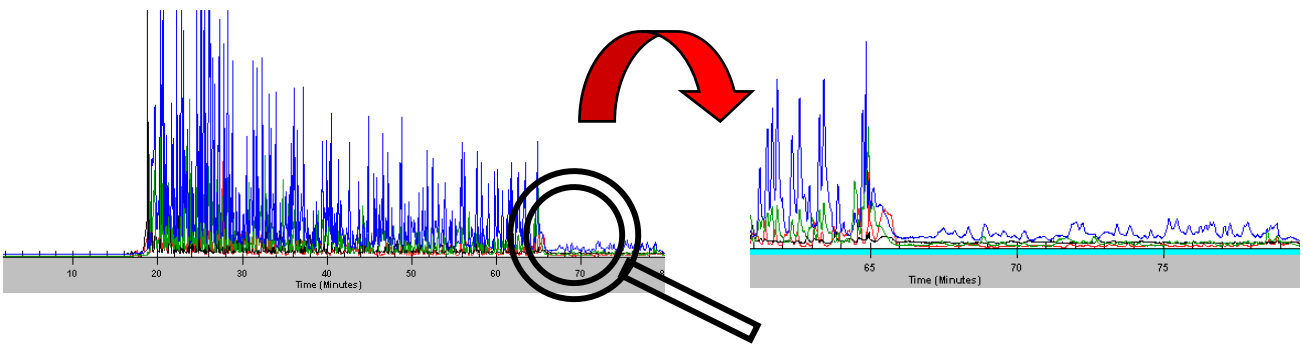
Plusieurs produits de PCR sont présents et ont été séquencés.

**REMEDES :**

- Vérifier la pureté du produit de PCR sur gel d'agarose.

- Purifier le produit de PCR.

Dans certains cas, les produits de PCR présentent de faibles niveaux de contamination dont l'apparence est la suivante :




**REMEDES :**

- Réduire l'injection des échantillons.

- Diminuer la quantité de matrice employée pour la réaction de séquençage.

- Augmenter la température d'hybridation lors de la réaction de PCR.

- Revoir le design des amorces de la PCR.

b) Contamination au niveau des amorces :

❶ Contamination par les amorces ayant servi à générer le produit de PCR séquencé :

**REMEDES :**

- Purifier les produits de PCR en les passant sur colonnes de filtration ou en les traitant Exo/SAP.

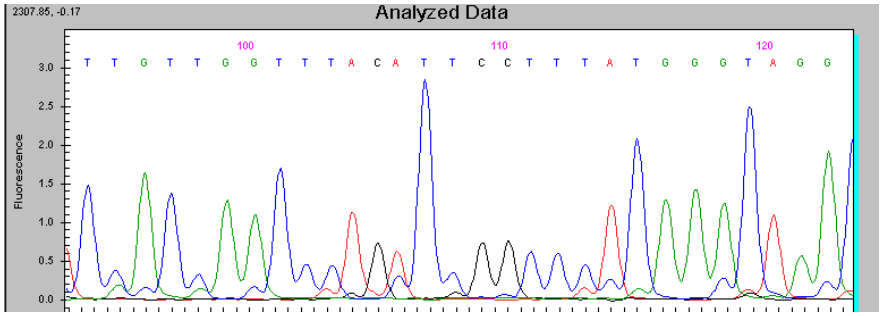
❷ Dégradation des amorces : phénomène de pics n-1

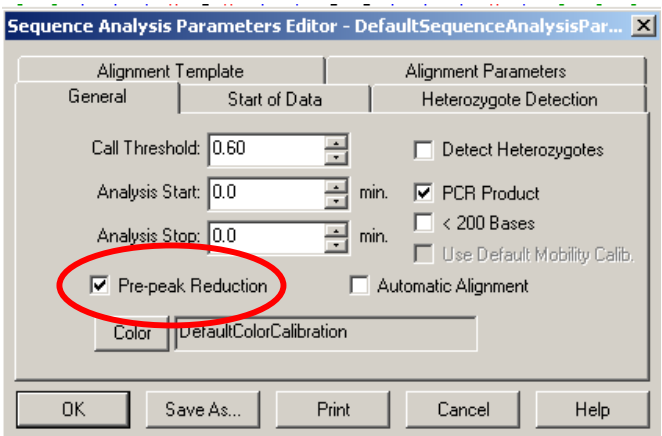
**REMEDES :**

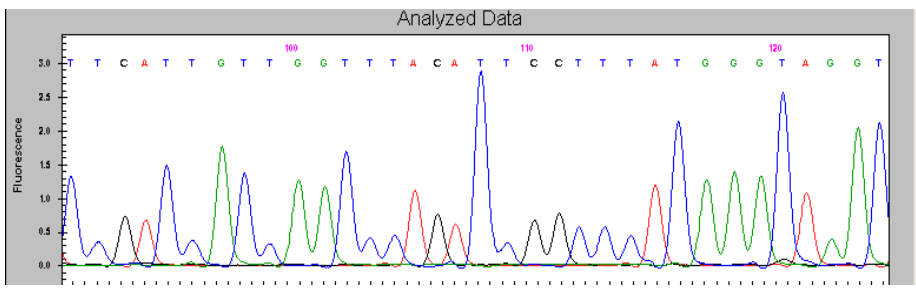
- Employer des amorces fraîchement préparées

- Re-synthétiser de nouvelles amorces

- Employer la fonction « réduction des pré-pics » dans le logiciel.


2307.85, -0.17
Analyzed Data
100
110
120
T T G T T G G T T T A C A T T C C T T T A T G G G T A G G
Fluorescence
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0


Sequence Analysis Parameters Editor - DefaultSequenceAnalysisPar...
Alignment Template
Alignment Parameters
General
Start of Data
Heterozygote Detection
Call Threshold: 0.60
Detect Heterozygotes
Analysis Start: 0.0
min.
PCR Product
Analysis Stop: 0.0
min.
< 200 Bases
Use Default Mobility Calib.
Pre-peak Reduction
Automatic Alignment
Color
DefaultColorCalibration
OK
Save As...
Print
Cancel
Help


Analyzed Data
100
110
120
T T C A T T G T T G G T T T A C A T T C C T T T A T G G G T A G G T
Fluorescence
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

## C- LES MATRICES DIFFICILES

Elles peuvent être classées en 3 catégories :

☛ Produits de PCR courts :

- Difficulté à purifier.

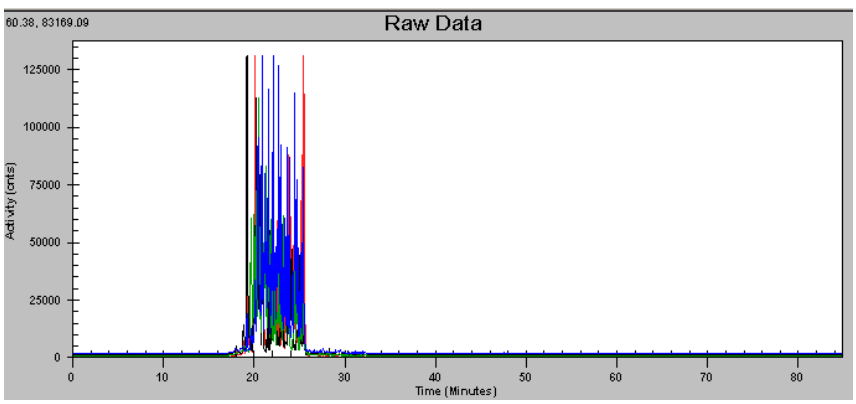
☛ Echantillons riches en GC :

- Formation de structures internes telles que des épingles à cheveux.

☛ Présence de polyA ou de polyT :

- Problème de dérapage de l'enzyme.

### 1) Les produits de PCR courts (< 200 pb) :




Lors de purification sur colonne, il est possible de perdre du matériel (faible rendement de récupération). Préférer alors la purification par traitement Exo/SAP (exonucléase + Shrimp Alkaline Phosphatase). La procédure est la suivante :

- Ajouter 0,05 U SAP + 0,1 U Exo par µl de réaction de PCR.

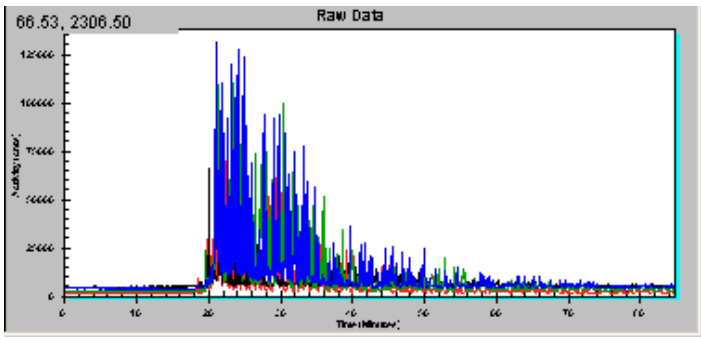
- Incuber à +37°C pendant 60 minutes.

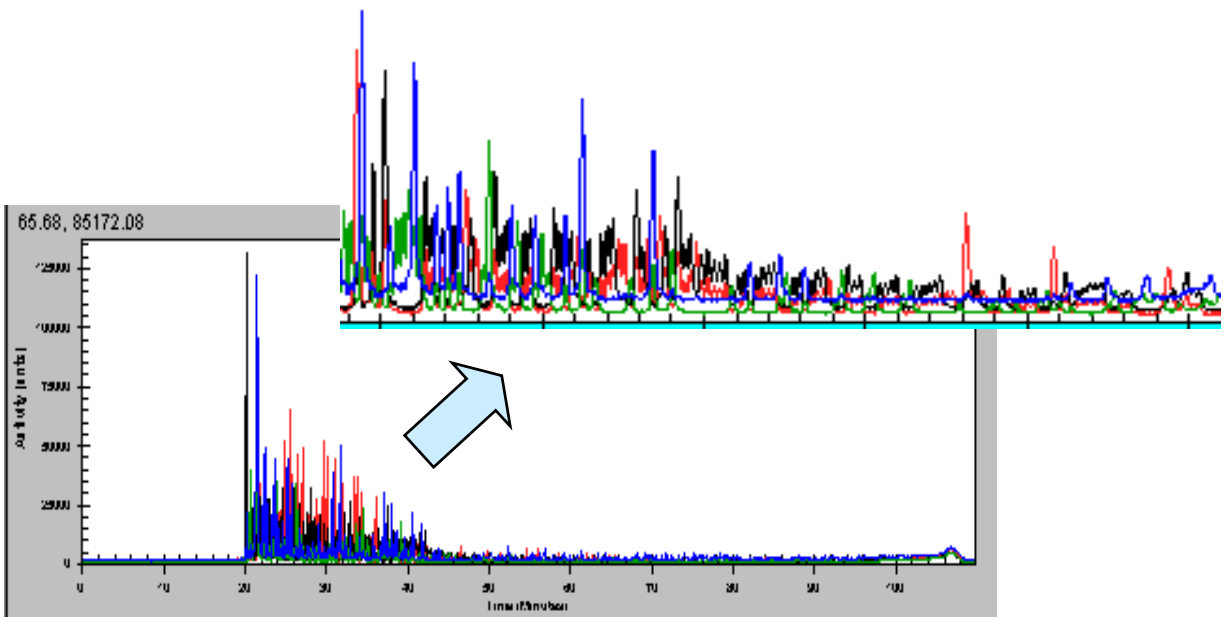
- Inactiver les enzymes pendant 15 minutes à une température > +75°C.

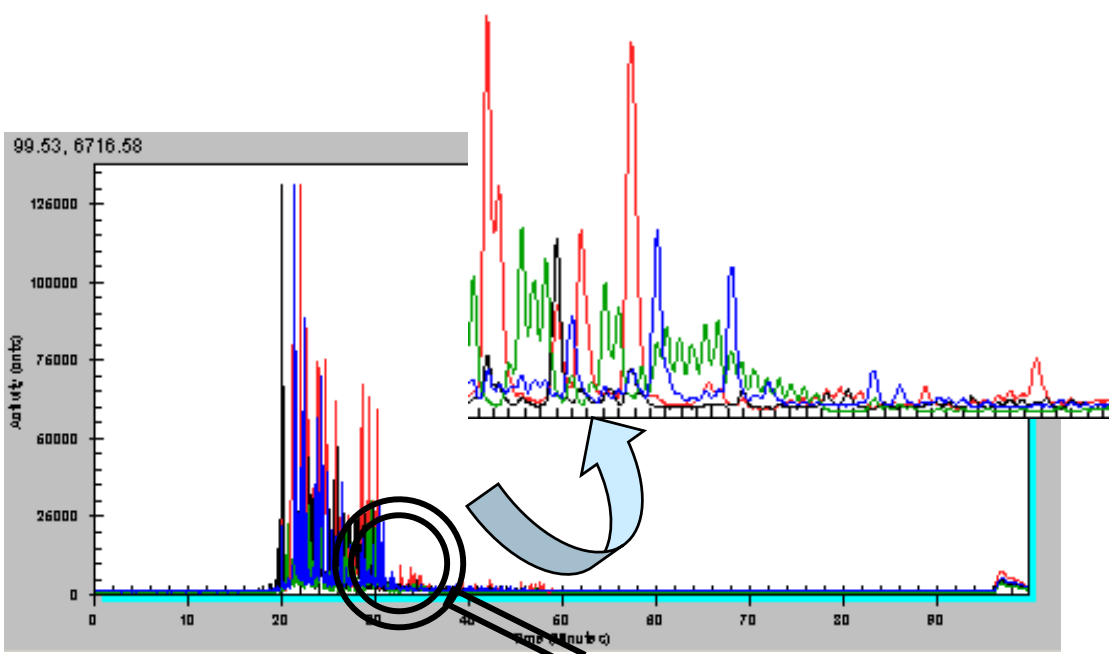
- Maintenir ensuite à +4°C.

### 2) Les matrices riches en GC :

La présence de zones riches en GC conduit fréquemment à une chute rapide voire une interruption des données brutes de fluorescence.


66.53, 2306.50
Raw Data


65.68, 85172.08


99.53, 6716.58
126000
100000
76000
60000
26000
0

**REMEDES :**

❶ Modification de la chimie :

➢ DMSO :

- Ne pas employer (dommageable pour les capillaires).

➢ Single Strand Binding Protein (Stratagene) :

- 0,5 µg pour 20 µl de réaction de séquençage DTCS.
- Fonctionne mieux avec le kit DTCS (réf. 608000) qu'avec le kit *Quick Start* (réf. 608120).

➢ Bétaine :

- Concentration finale 0,7 à 2 M par réaction de séquençage.
- Fonctionne très bien avec les 2 types de kits (réf. 608000 et 608120).

➢ DéazaGTP :

- Remplace le mix de dNTPs du kit DTCS (réf. 608000)
  - composés séparés de chez Sigma, USB,…
- Ajuster les dNTPs à une concentration finale de 0,6 mM
  - utiliser le déaza GTP en lieu et place du dITP.
- La température d'extension employée sera de +72°C.

❷ Pré-traitement à la chaleur :

➢ De 1 à 5 minutes.

❸ Ajustement des conditions de thermocyclage :

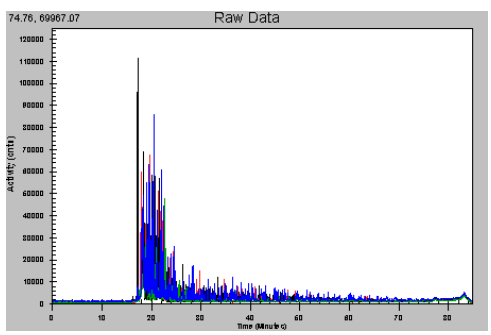
➢ Hot start :

- 2 minutes à +96°C.

➢ 30 cycles de :

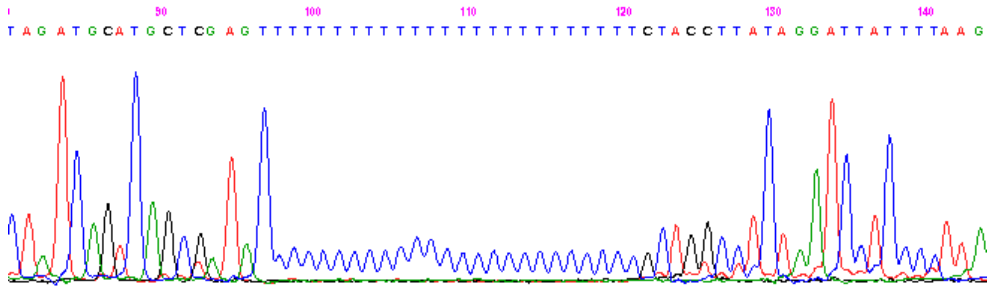
- 30 secondes à +96°C,
- 4 minutes à +60°C.

➢ Maintien à +4°C.



### 3) Présence de polyA et de polyT :

Le principal problème est le dérapage de la polymérase sur de telles structures. La fonction de réduction des pré-pics peut être utile.




Dans certains cas, spécifiques de la séquence étudiée :

- on peut essayer de redéfinir la position d'hybridation de l'amorce employée.
- essayer la chimie du kit DTCS (réf. 608000) et celle du kit *Quick Start* (réf. 608120).

## *En conclusion*

La conduite générale à tenir en cas de dysfonctionnement est de regarder les problèmes communs, rattachés à :

- une amorce donnée,
- une matrice donnée, un type d'échantillon donné,
- une méthode de purification donnée,
- un utilisateur en particulier,
- etc…

☛ Ne pas hésiter à nous contacter pour obtenir de l'aide.